

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

7

| | | |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference FZJ 9909 PCT | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/EP00/07370 | International filing date (day/month/year) 31 July 2000 (31.07.00) | Priority date (day/month/year) 09 August 1999 (09.08.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/53, | | |
| Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

| | |
|--|--|
| Date of submission of the demand 01 March 2001 (01.03.01) | Date of completion of this report 28 November 2001 (28.11.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |



I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-8, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-20, filed with the letter of 10 September 2001 (10.09.2001),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1-11, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

P/EP 00/07370

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|--|-----|
| Novelty (N) | Claims | 3-5,7,8; 9-14 partially; 15-17;18-20 partially | YES |
| | Claims | 1,2,6; 9-14 partially; 18-20 partially | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 3-5 partially,7,8; 9-14, partially; 18-20 partially | YES |
| | Claims | 1,2; 3-5 partially; 6; 9-14 partially; 15-17; 18-20 partially | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-20 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

SEE SUPPLEMENTAL SHEET



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOXES I, V and VIII

1. PCT Article 34(2) (b)

The amended Claims 1-20 appear to meet the requirements of PCT Article 34(2) (b). However, it should be noted that the original application documents to which the applicant refers to support the submitted amendments obviously do not match the application documents available to the Examining Authority. The application as originally filed contains an 8-page description. However, the applicant refers for example to a page 11, lines 29-34, with regard to the amended Claims 6, 7 and 8. Likewise, page 7, lines 19-30, does not contain any disclosure relevant to the amended Claim 9.

2. PCT Article 33(2) and (3)

Part of the amended Claims 1-20 continues not to meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3). Document "Henke et al., J. of Biol. Chem., Vol. 273, No. 6, 1998, pages 3702-3711" describes the identification of a peroxisomal isocitrate dehydrogenase (Idp3) and the gene from *S. cerevisiae* that encodes it, as well as its recombinant expression in *E. coli* cells transformed accordingly (see Fig. 3, page 3706, left-hand column, second paragraph, and right-hand column, including second paragraph; and page 3709, right-hand column, first paragraph). The transformed *E. coli* cells show a massive increase in isocitrate dehydrogenase activity. Claim 1 concerns a micro-organism for the biotechnical production of riboflavin characterised in that it shows higher



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOXES I, V and VIII

NAD(P)H-forming enzyme activity than a wild type of the species *Ashbya gossypii*, ATCC 10895 (see also item 3). The intended use, that is the biotechnical production of riboflavin, should be considered to be an optional and hence non-restrictive feature as long as corresponding characterising, specific (i.e. novel) features of the micro-organism which are specially required for this use are not indicated. Consequently, *E. coli* containing rib genes (see, for example, EP-A-0 405 370, page 3, lines 25-30) would likewise be suitable for the biosynthesis of riboflavin even if this was not demonstrated by Henke et al., since that document highlighted mainly the verification of the cloned *Idp3*. Moreover, it should be noted that Claim 1 concerns a micro-organism that shows increased activity of an NAD(P)H-forming enzyme. It does not refer to the actual NAD(P)H content produced in the cell. Claim 1 is therefore not considered novel and inventive within the meaning of PCT Article 33(2) and (3). This also applies to dependent Claims 2 and Claims 11, 12, 19 and 20, insofar as they refer directly or indirectly to Claim 6 (see below).

Claim 6 is not considered novel and inventive because the *Idp3* gene known from Henke et al. is 65% identical to the DNA sequence of the *Idp3* gene described in the present application and is therefore covered by the term "allelic variant" (see the definition of the term "allelic variant" on page 6, lines 3-6). This also applies to Claims



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOXES I, V and VIII

copies of the Idp3 gene, which would both result in an increased activity (see also Claim 11). The circumstances which lead to increased activity are not clear from the present wording. Thus the increased Idp3 activity could be due merely to modified culture conditions. Moreover, a comparison would be meaningful only if two micro-organisms of the same species were compared, such as the Idp3 content in the wild type strain of *A. gossypii*, ATCC 10895, in specific growth conditions and the Idp3 content of a "genetically modified" strain of *A. gossypii*, ATCC 10895, in the same growth conditions.

4. Finally, the applicant should note that the PCT and the European proceedings differ from one another, *inter alia*, in that the last phase of the PCT phase is the establishment of a preliminary examination report, not of a binding decision, and that therefore the right to a legal hearing cannot be harmed.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/11052 A3

PCT

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53,
15/80, 9/04, 1/15, C12P 25/00 // (C12N 1/15, C12R 1:645)

20, D-52428 Jülich (DE). MAETING, Ines [DE/DE];
Wiesenstr. 3, D-52428 Jülich (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07370

(74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Lintorfer Strasse 10, D-40878
Ratingen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Juli 2000 (31.07.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 37 548.8 9. August 1999 (09.08.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): BASF AKTIENGESellschaft [DE/DE];
D-67056 Ludwigshafen (DE). FORSCHUNGSZEN-
TRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; D-52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): ALTHÖFER, Hen-
ning [DE/DE]; Mainstrasse 12, D-67117 Limburgerhof
(DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Rossmarktstrasse
27, D-67346 Speyer (DE). REVUELTA DOVAL, Jose
L. [ES/ES]; Grillo 11 4E, E-37001 Salamanca (ES).
SANTOS GARCIA, Maria Angeles [ES/ES]; C/Escue-
las, 1-5, E-37001 Salamanca (ES). SAHM, Hermann
[DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE).
STAHMANN, Klaus-Peter [DE/DE]; Wilhelmstrasse

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 5. Juli 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MONOCELLULAR OR MULTICELLULAR ORGANISMS FOR THE PRODUCTION OF RIBOFLAVIN

(54) Bezeichnung: EIN- ODER MEHRZELLIGE ORGANISMEN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN

(57) Abstract: The invention relates to a monocellular or multicellular organism, especially a microorganism, for biotechnological production of riboflavin, whereby the enzymatic activity thereof with respect to NAD(P)H formation is higher than that of a wild type of species *Ashbya gossypii* ATCC10895.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft einen ein- oder mehrzelligen Organismus, insbesondere Mikroorganis-
mus, zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin, wobei dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H Bildung höher ist als
derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.


WO 01/11052 A3

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|---|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts FZJ 9909 PCT | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07370 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 31/07/2000 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 09/08/1999 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/53 | | |
| Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al. | | |
| <p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.</p> | | |
| <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none">I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des BerichtsII <input type="checkbox"/> PrioritätIII <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche AnwendbarkeitIV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der ErfindungV <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser FeststellungVI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte UnterlagenVII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen AnmeldungVIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung | | |
| Datum der Einreichung des Antrags 01/03/2001 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 28.11.2001 | |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter A. M. Merlos Tel. Nr. +49 89 2399 8559 | |



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/0737

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-8 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-20 eingegangen am 13/09/2001 mit Schreiben vom 10/09/2001

Zeichnungen, Blätter:

1-11 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07370

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | | |
|--------------------------------|-----------------|--|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche | 3-5, 7, 8; 9-14 teilweise; 15-17; 18-20 teilweise |
| | Nein: Ansprüche | 1, 2, 6; 9-14, teilweise; 18-20 teilweise |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche | 3-5 teilweise, 7, 8; 9-14, teilweise; 18-20 teilweise |
| | Nein: Ansprüche | 1, 2; 3-5 teilweise; 6; 9-14 teilweise; 15-17; 18-20 teilweise |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche | 1-20 |
| | Nein: Ansprüche | |

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



1. Art. 34 (2,b) PCT

Die geänderten Ansprüche 1-20 scheinen den Anforderungen des Art. 34(2,b) PCT zu entsprechen. Es sei in diesem Zusammenhang aber darauf hingewiesen, dass offensichtlich die ursprünglichen Anmeldungsunterlagen, auf die zur Stützung der eingeführten Änderungen Bezug genommen wurde, nicht mit den der Behörde vorliegenden Anmeldungsunterlagen übereinstimmen. Die Anmeldung wie ursprünglich eingereicht, enthält eine Beschreibung von acht Seiten. Mit Hinblick auf die geänderten Ansprüche 6, 7 und 8 wurde aber beispielsweise auf eine Seite 11, Zeilen 29-34 Bezug genommen. Ebenso befindet sich auf Seite 7, Zeilen 19-30 keine sinngemässe Offenbarung für den geänderten Anspruch 9.

2. Art. 33(2), (3) PCT

Ein Teil der geänderten Ansprüche 1-20 scheint nach wie vor nicht den Anforderungen des Art. 33(2), (3) PCT zu entsprechen. Dokument "Henke et al., J. of Biol Chem., Bd. 273, Nr. 6, 1998, 3702-3711", beschreibt die Identifizierung einer peroxisomalen Isocitrat-Dehydrogenase (Idp3) und des sie kodierenden Gens aus *S. cerevisiae*, sowie dessen rekombinante Expression in entsprechend transformierten *E. coli* Zellen (s. Fig. 3, S. 3706, linke Spalte, zweiter Absatz und rechte Spalte, einschl. zweiter Absatz, Seite 3709, rechte Spalte erster Absatz). Die transformierten *E. coli* Zellen zeigten einen massiven Anstieg der Isocitratdehydrogenase-Aktivität. Anspruch 1 bezieht sich auf einen Mikroorganismus zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er eine Aktivität eines NAD(P)H bildenden Enzyms aufweist, die höher ist als diejenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC 10895 (s. auch unter Punkt 3.). Der beabsichtigte Verwendungszweck, also die biotechnische Herstellung von Riboflavin, ist als optionales und daher nicht limitierendes Merkmal anzusehen, solange nicht den Mikroorganismus entsprechend kennzeichnende spezifische (d.h. neuheitsgebende) und speziell für diesen Zweck benötigte Merkmale aufgeführt sind. Daher wäre *E. coli*, welches rib Gene enthält (s. beispielsweise E0 0 405 370, Seite 3, Zeilen 25-30) gleichermassen für die Biosynthese von Riboflavin geeignet, auch wenn dies von Henke et al. nicht nachgewiesen wurde, da hier lediglich die Verifizierung der klonierten Idp3 im Vordergrund stand. Zudem sei darauf hingewiesen, dass sich Anspruch 1 auf einen Mikroorganismus bezieht, der eine erhöhte Aktivität

bezüglich eines NAD(P)H bildenden Enzyms aufweist. Zur Höhe des tatsächlich in der Zelle gebildeten NAD(P)H-Gehalts wird auch hier nicht Bezug genommen. Anspruch 1 wird daher nicht als neu und erfinderisch im Sinne von Art. 33(2), (3) PCT angesehen. Dies gilt ebenso für den abhängigen Anspruch 2 und die Ansprüche 11, 12, 19 und 20, soweit sie sich direkt oder indirekt auf Anspruch 6 rückbeziehen (s. unten).

Anspruch 6 wird nicht als neu und erfinderisch angesehen, da das aus Henke et al. bekannte ldp3-Gen zu 65% identisch ist mit der in der gegenwärtigen Anmeldung beschriebenen DNA-Sequenz des ldp3-Gens und somit unter den Begriff "Allelvariation" fällt (s. Definition des Begriffes Allelvariation auf Seite 6, Zeilen 3-6). Dies gilt ebenfalls für die Ansprüche 9 und 10.

Die Ansprüche 3-5 scheinen sich auf einen neuen und soweit sie sich auf Anspruch 2 rückbeziehen auch auf einen erfinderischen Gegenstand zu beziehen. Dies gilt auch für die direkt abhängigen Ansprüche 14, 18. Ansprüche 7, 8 sowie davon direkt oder indirekt abhängige Ansprüche 9-14 und 18 können ebenfalls als neu und erfinderisch angesehen werden.

3. Art. 5/6 PCT

Der gegenwärtigen Erfindung liegt die Entdeckung zugrunde, dass mit einer verstärkten Isocitrat-dehydrogenase-Expression im Pilz *Ashbya* ATCC 10895 auch ein deutlicher Anstieg der Riboflavinbildung einhergeht. Allerdings lässt sich aus dieser Beobachtung kein allgemein gültiges Prinzip ableiten, wonach der Anstieg irgendeines anderen NAD(P)H bildenden Enzyms zum gleichen Ergebnis führt. Mit Hinblick auf die auf ldp3 limitierte Beschreibung, sind die Ansprüche, die lediglich vage auf ein NAD(P)H bildendes Enzym gerichtet sind, zu breit und daher nicht mit den Erfordernissen des Art. 5 vereinbar.

Desweiteren sei darauf hingewiesen, dass ohne spezifischen Vergleichswert oder klare Definition des Vergleichswerts (bspw. ldp3-Gehalt unter spezifischen Wachstumbedingungen) oder Angabe eines präzisen, strukturellen Merkmals (bspw. verstärkte Expression oder erhöhte Kopienzahl des ldp3-Gens, die beide eine erhöhte Aktivität zur Folge haben, s. auch Anspruch 11), Anspruch 1 (auch Ansprüche 2-3) unklar ist (Art. 6 PCT), da aus der derzeitigen Formulierung nicht eindeutig hervorgeht, aufgrund welcher Umstände die Aktivität erhöht ist. So könnten auch lediglich geänderte Kulturbedingungen eine erhöhte ldp3-Aktivität bewirken. Zudem scheint ein Vergleich nur zwischen zwei Mikroorganismen der

gleichen Species sinnvoll, d.h. Idp3-Gehalt im Wildtypstamm *A. gossypii* ATCC10895 unter entsprechend spezifizierten Wachstumsbedingungen und Idp3-Gehalt eines "genetisch veränderten" Stamms von *A. gossypii* ATCC10895 unter den gleichen Wachstumsbedingungen.

4. Schliesslich sei der Anmelder darauf hingewiesen, dass sich das PCT und Euro-Verfahren unter anderem darin unterscheiden, dass in der PCT-Phase als letzte Aktion lediglich ein vorläufiger Prüfungsbericht erstellt wird, aber keine bindende Entscheidung getroffen wird, sodass ein Recht auf rechtliches Gehör nicht verletzt werden kann.



Neue Ansprüche 1-20:

1. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin, **dadurch gekennzeichnet, daß** er eine Aktivität eines NAD(P)H-bildenden Enzyms aufweist, die höher ist als diejenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.
2. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** er eine erhöhte Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität aufweist.
3. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Pilz ist.
4. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Pilz aus der Gattung *Ashbya* ist.
5. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Pilz der Spezies *Ashbya gossypii* ist.
6. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen mit einer für die in Fig. 11 (SEQ ID No. 2) angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
7. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach Anspruch 6 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1 bis 1262 gem. der Fig. 11 (SEQ ID No. 1).
8. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 oder 7 mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz mit Nukleotid -661 bis -1 gem. der Fig. 11 (SEQ ID No. 1).
9. Gen-Struktur enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8 sowie mit diesem operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen.
10. Vektor enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8 oder eine Gen-Struktur nach Anspruch 9.

11. Genetisch veränderter Mikroorganismus zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin enthaltend in replizierbarer Form ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8, welches im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus verstärkt exprimiert wird und/oder deren Kopienzahl erhöht ist.
12. Genetisch veränderter Mikroorganismus gemäß Anspruch 11 enthaltend eine Gen-Struktur nach Anspruch 9 oder einen Vektor nach Anspruch 10.
13. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 11 oder 12 enthaltend eine Isocitrat-Dehydrogenase, die im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus eine gesteigerte katalytische Aktivität und/oder eine verringerte Hemmbarkeit gegenüber Inhibitoren aufweist.
14. Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin, **dadurch gekennzeichnet, daß** ein Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 11 bis 13 eingesetzt wird.
15. Verfahren zur Herstellung eines Riboflavin produzierenden ein- oder mehrzelligen Mikroorganismus, **dadurch gekennzeichnet, daß** durch gentechnische Methoden die Aktivität eines NAD(P)H-bildenden Enzyms im Vergleich zu derjenigen eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895 erhöht wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Erhöhung der Enzymaktivität durch Austausch des Promotors und/oder Erhöhung der Genkopienzahl erzielt wird.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Erhöhung der Enzymaktivität durch eine gesteigerte katalytische Aktivität und/oder eine verringerte Hemmbarkeit gegenüber Inhibitoren der Isocitrat-Dehydrogenase erzeugt wird.
18. Verwendung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 11 bis 13 zur Herstellung von Riboflavin.

19. Verwendung eines Isocitrat-Dehydrogenase-Gens nach einem der Ansprüche 6 bis 8 zur Herstellung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 11 bis 13.
20. Verwendung einer Gen-Struktur nach Anspruch 9 oder eines Vektors nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 11 bis 13.

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
12 April 2001 (12.04.01)

International application No.
PCT/EP00/07370

Applicant's or agent's file reference
FZJ 9909 PCT

International filing date (day/month/year)
31 July 2000 (31.07.00)

Priority date (day/month/year)
09 August 1999 (09.08.99)

Applicant

ALTHÖFER, Henning et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
01 March 2001 (01.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

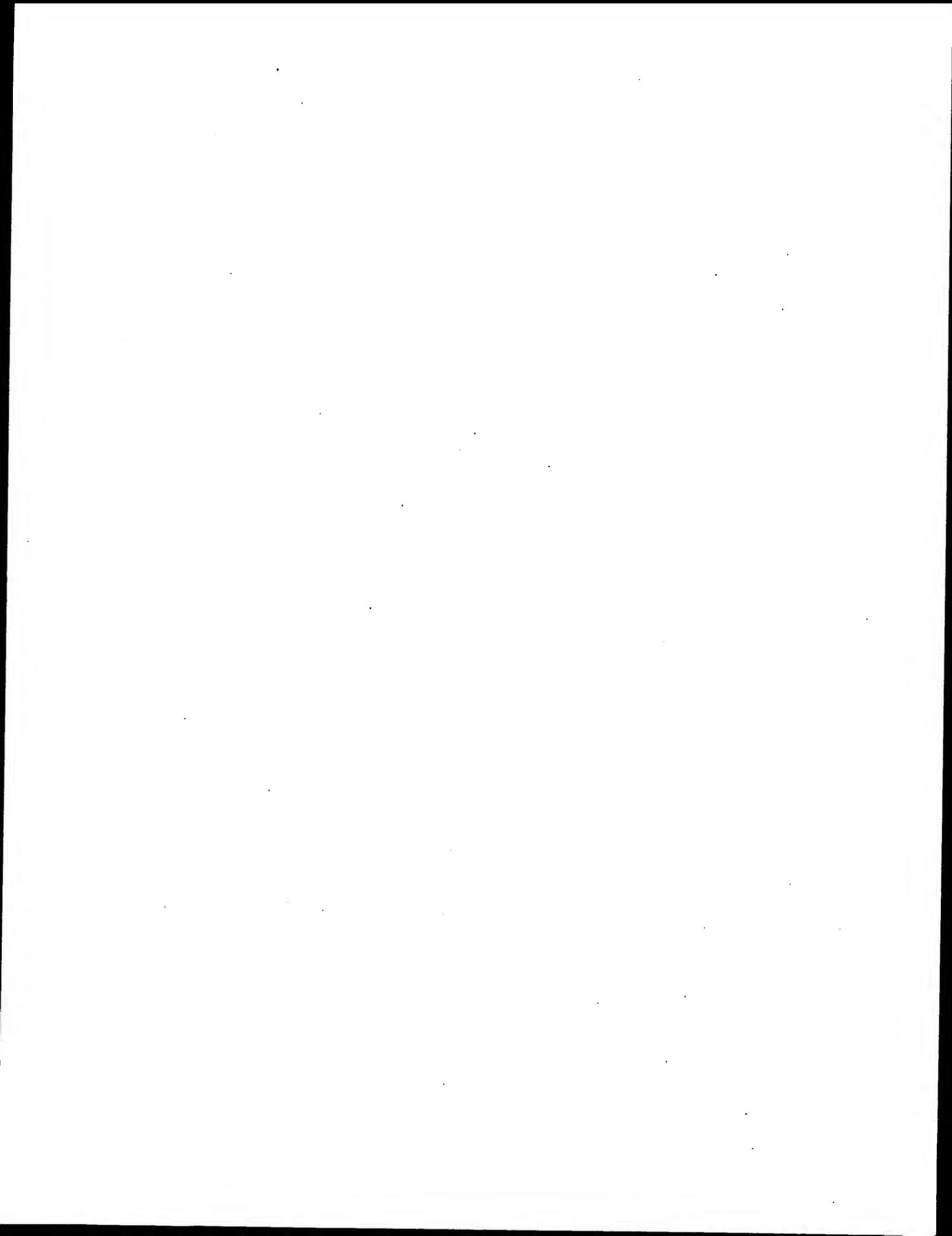
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Zakaria EL KHODARY

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



5 Ein- oder mehrzellige Organismen zur Herstellung von Riboflavin

Die vorliegende Erfindung betrifft einen ein- oder mehrzelligen Organismus zur Herstellung von Riboflavin.

- 10 Das Vitamin B₂, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier essentiell. Bei Vitamin-B₂-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, Risse in den Mundwinkeln, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten u. a. Hautschäden, Bindehautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei
- 15 Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme eintreten. Das Vitamin B₂ hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminpräparat bei Vitaminmangel sowie als Futtermittelzusatz. Daneben wird es auch als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc., eingesetzt.

- 20 Die Herstellung von Riboflavin erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell. Bei den chemischen Herstellungsverfahren wird das Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei allerdings auch relativ kostspielige Ausgangsprodukte – wie beispielsweise D-Ribose – eingesetzt werden müssen.
- 25

- Eine Alternative zur chemischen Herstellung des Riboflavins bietet die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Die mikrobielle Herstellung des Riboflavins eignet sich insbesondere für solche Fälle, in denen eine hohe Reinheit dieser Substanz nicht erforderlich ist. Dies ist
- 30 beispielsweise dann der Fall, wenn das Riboflavin als Zusatz zu Futtermittelprodukten eingesetzt werden soll. In solchen Fällen hat die mikrobielle Herstellung des Riboflavins den Vorteil, daß diese Substanz in einem einstufigen Prozeß gewinnbar ist. Auch können als

- 5 Ausgangsprodukte für die mikrobielle Synthese nachwachsende Rohstoffe, wie beispielsweise pflanzliche Öle, eingesetzt werden.

Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Ashbya gossypii* oder *Eremothecium ashbyi* ist bekannt (The Merck Index,
10 Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983, A. Bacher, F. Lingens, Angew. Chem. 1969, S. 393); aber auch Hefen, wie z.B. *Candida* oder *Saccharomyces*, und Bakterien wie *Clostridium*, *Bacillus* und *Corynebakterium* sind zur Riboflavinproduktion geeignet.

- 15 Zudem sind Verfahren mit der Hefe *Candida famata* beispielsweise in der US 05231007 beschrieben.

Riboflavin-überproduzierende Bakterienstämme sind beispielsweise in der EP 405370 beschrieben, wobei die Stämme durch Transformation der
20 Riboflavin- Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden. Diese Prokaryonten-Gene waren aber für ein rekombinantes Riboflavin-Herstellungsverfahren mit Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Ashbya gossypii* ungeeignet. Daher wurden gemäß der WO 93/03183 für die Riboflavin-Biosynthese spezifische Gene aus einem
25 Eukaryonten, nämlich aus *Saccharomyces cerevisiae*, isoliert, um damit ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin in einem eukaryontischen Produktionsorganismus bereitzustellen. Derartige rekombinante Herstellungsverfahren haben für die Riboflavin-Produktion jedoch dann keinen oder nur begrenzten Erfolg, wenn die Bereitstellung
30 von Substrat für die an der Riboflavin-Biosynthese spezifisch beteiligten Enzyme unzureichend ist.

1967 fand Hanson (Hanson AM, 1967, in Microbial Technology, Peppler, HJ, pp.222-250 New York), daß der Zusatz der Aminosäure Glycin die
35 Riboflavin-Bildung von *Ashbya gossypii* steigert. Ein derartiges Verfahren

- 5 ist jedoch nachteilig, weil Glycin ein sehr teurer Rohstoff ist. Aus diesem Grunde war man bestrebt, durch Herstellung von Mutanten die Riboflavin-Produktion zu optimieren.

- 10 Aus der DE 19545468.5 A1 ist ein weiteres Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin bekannt, bei dem die Isocitratlyase-Aktivität oder die Isocitratlyase-Genexpression eines Riboflavin produzierenden Mikroorganismus erhöht ist. Darüber hinaus ist aus der DE 19840709 A1 ein ein- oder mehrzelliger Organismus insbesondere ein Mikroorganismus zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin bekannt. Dieser zeichnet
15 sich dadurch aus, daß einen derart veränderten Glycinstoffwechsel aufweist, daß seine Riboflavinsyntheseleistung ohne externe Zufuhr von Glycin mindestens gleich derjenigen eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10892 ist.

- 20 Aber auch im Vergleich zu diesen Verfahren besteht noch ein Bedarf zu einer weiteren Optimierung der Riboflavin-Herstellung.

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demgemäß, einen ein- oder mehrzelligen Organismus, vorzugsweise einen Mikroorganismus, für die
25 biotechnische Herstellung von Riboflavin zur Verfügung zu stellen, der eine weitere Optimierung der Riboflavin-Bildung ermöglicht. Insbesondere sollte ein Organismus zur Verfügung gestellt werden, der eine Produktion ermöglicht, die gegenüber dem bisherigen Stand der Technik wirtschaftlicher ist. Vor allem soll der Organismus eine im Vergleich zu den
30 bisherigen Organismen erhöhte Riboflavin-Bildung erlauben.

Diese Aufgabe wird durch einen ein- oder mehrzelligen Organismus gelöst, dessen Enzymaktivität der bezüglich NAD(P)H-Bildung höher ist als derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.

5 Das Ziel einer beschleunigten intrazellulären NAD(P)H-Versorgung kann durch Erhöhung der Aktivität eines NAD(P)H-bildenden bzw. Senkung der Aktivität eines NAD(P)H verbrauchenden Enzyms bzw. eine Änderung der Spezifität erreicht werden. Dies läßt sich mit den bekannten Methoden der Stammverbesserung von Organismen erreicht werden. D. h. im
10 einfachsten Falle lassen sich entsprechende Stämme nach der in der Mikrobiologie üblichen Selektion mittels Screening herstellen. Ebenso ist die Mutation mit anschließender Selektion einsetzbar. Die Mutation kann hierbei sowohl mittels chemischer als auch mittels physikalischer Mutagenese ausgeführt werden. Eine weitere Methode ist die Selektion
15 und Mutation mit anschließender Rekombination. Schließlich lassen sich die erfindungsgemäßen Organismen mittels Genmanipulation herstellen.

Erfindungsgemäß wird der Organismus derart verändert, daß er intrazellulär NAD(P)H in einer Menge erzeugt, die größer als sein Bedarf
20 für die Aufrechterhaltung seines Metabolismus ist. Diese Erhöhung der intrazellulären NAD(P)H-Erzeugung läßt sich erfindungsgemäß vorzugsweise dadurch erreichen, daß ein Organismus hergestellt wird, bei dem die Enzymaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase erhöht ist. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, daß durch Veränderung des
25 katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikation oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren,
30 hervorgerufen werden.

Die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität kann erfindungsgemäß vorzugsweise durch Mutation des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens erhöht werden. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen
35 Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-

- 5 Bestrahlung oder mutationsauslösende Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden, wie Deletion, Insertion und/oder Nukleotid-Austausch.

10 Die Isocitrat-Dehydrogenase-Genexpression kann durch Einbau von Isocitrat-Dehydrogenase-Genkopien und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Isocitrat-Dehydrogenase-Genexpression positiv beeinflussen, erreicht werden. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf Transcriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transcriptionssignale erhöht werden. Daneben ist
15 aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl kann beispielsweise das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut
20 werden, der vorzugsweise dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält, insbesondere solche, die die Genexpression verstärken. Anschließend wird ein Riboflavin-produzierender Mikroorganismus, mit dem das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen enthaltenden Genkonstrukt transformiert.

25 Erfindungsgemäß kann die Überexpression der Isocitrat-Dehydrogenase auch durch Austausch des Promotors erzielt werden. Hierbei ist es möglich, die höhere enzymatische Aktivität alternativ durch Einbau von Genkopien oder durch Austausch des Promotors zu erzielen.
30 Gleichmaßen ist es jedoch auch möglich, durch gleichzeitigen Austausch des Promotors und Einbau von Genkopien die gewünschte Änderung der Enzymaktivität zu erzielen.

Die Veränderung des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens führt zu einer
35 beschleunigten NAD(P)H-Bildung und zugleich zu einer überraschend

- 5 hohen Steigerung der Riboflavin-Bildung, wie sie bisher nicht erreichbar war.

Das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen wird vorzugsweise aus Mikroorganismen, besonders bevorzugt aus Pilzen, isoliert. Dabei sind
10 Pilze der Gattung *Ashbya* wiederum bevorzugt. Höchst bevorzugt ist die Spezies *Ashbya gossypii*.

Für die Isolierung des Gens kommen aber auch alle weiteren Organismen, deren Zellen die Sequenz zur Bildung der Isocitrat-Dehydrogenase
15 enthalten, also auch pflanzliche und tierische Zellen, in Betracht. Die Isolierung des Gens kann durch homologe oder heterologe Komplementation einer im Isocitrat-Dehydrogenase-Gen defekten Mutante oder auch durch heterologes Probing oder PCR mit heterologen Primern erfolgen. Zur Subklonierung kann das Insert des komplementierenden
20 Plasmids anschließend durch geeignete Schritte mit Restriktionsenzymen in der Größe minimiert werden. Nach Sequenzierung und Identifizierung des putativen Gens erfolgt eine paßgenaue Subklonierung durch PCR. Plasmide, die die so erhaltenen Fragmente als Insert tragen, werden in die Isocitrat-Dehydrogenase-Gen-Defekte Mutante eingebracht, die auf
25 Funktionalität des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens getestet wird. Funktionelle Konstrukte werden schließlich zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten eingesetzt.

Nach Isolierung und Sequenzierung sind die Isocitrat-Dehydrogenase-
30 Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die angegebene Aminosäure-Sequenz oder deren Allelvariation kodieren. Allelvariationen umfassen insbesondere Derivate, die durch Deletion, Insertion und Substitution von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität erhalten bleibt. Eine

- 5 entsprechende Sequenz ist in Figur 2b von Nukleotid 1 bis 1262 angegeben.

Den Isocitrat-Dehydrogenase-Genen ist insbesondere ein Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid -661 bis -1 gem. Fig. 11 oder eine im wesentlichen gleich wirkende DNA-Sequenz vorgeschaltet. So kann
10 beispielsweise dem Gen ein Promotor vorgeschaltet sein, der sich von dem Promotor mit der angegebenen Nukleotidsequenz durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion und/oder Deletion unterscheidet, ohne daß aber die Funktionalität bzw. die Wirksamkeit des
15 Promotors beeinträchtigt wird. Des weiteren kann der Promotor durch Veränderung seiner Sequenz in seiner Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksame Promotoren ausgetauscht werden.

Dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen können des weiteren regulatorische
20 Gen-Sequenzen bzw. Regulatorgene zugeordnet sein, die insbesondere die Isocitrat-Dehydrogenase-Gen-Aktivität erhöhen. So können dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen beispielsweise sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Isocitrat-Dehydrogenase-Expression
25 bewirken.

Dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne Regulator-Gen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in
30 einer Gen-Struktur enthalten ist. Durch Klonierung des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen enthalten und zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in
35 zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch

- 5 homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Bei den erfindungsgemäß erhaltenen ein- oder mehrzelligen Organismen kann es sich um beliebige für biotechnische Verfahren einsetzbare Zellen
10 handeln. Hierzu zählen beispielsweise Pilze, Hefen, Bakterien sowie pflanzliche und tierische Zellen. Erfindungsgemäß handelt es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von Pilzen, besonders bevorzugt von Pilzen der Gattung *Ashbya*. Hierbei ist die Spezies *Ashbya gossypii* besonders bevorzugt.

15

Im folgenden wird die Erfindung näher anhand von Beispielen erläutert, ohne daß damit eine Begrenzung auf den Gegenstand der Beispiele verbunden sein soll:

- 20 Das Gen der Isocitrat-Dehydrogenase (IDP3) wurde durch PCR kloniert und dann sequenziert (Sequenz siehe Fig. 11). Die gentechnisch durchgeführte partielle Deletion des Gens durch Austauschmutagenese mit einem Geneticinresistenz-Gen (Fig. 1) wurde durch Southern Blot (Fig. 2) bestätigt. Diese Disruption, d.h. Zerstörung des Gens im Genom des
25 Pilzes, führt dazu, daß der Pilz die davon kodierte Isocitrat-Dehydrogenase nicht mehr bilden kann. Fig. 3 zeigt die Abnahme der Enzymaktivität im Disruptionsstamm *AgΔDP3b* im Vergleich zum Wildtyp ATCC 10895. In Präparationen der Peroxisomen konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym in diesen Organellen lokalisiert ist (Fig. 10). Während
30 die Enzymaktivität in Wildtyp-Peroxisomen deutlich messbar ist, findet sich in den Peroxisomen des Disruptionsstamms keine Aktivität mehr.

Die Disruption des Gens führt zu einer deutlichen Verminderung der Vitaminbildung im Vergleich zum Elternstamm (Fig. 4). Wird das Gen
35 dagegen unter Steuerung des starken TEF-Promotors auf einem Plasmid

- 5 (Fig. 6) in zusätzlicher Kopie in die Ashbya-Zellen gebracht, ist ein deutlicher Anstieg in der Enzymaktivität und der Riboflavinbildung meßbar (Fig. 5).

- 10 Fig. 7 zeigt, daß bei der Verstoffwechselung ungesättigter Fettsäuren NADPH bei zwei von drei alternativen Reaktionswegen als Reduktionsmittel benötigt wird. Die darin involvierte 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase konnte in Zellen von Ashbya ebenfalls in Peroxisomen lokalisiert werden (Fig. 8). Die Disruption des IDP3-Gens sollte nun zu einem verringerten Wachstum der Zellen auf Linolsäure oder Linolensäure
15 führen. Das konnte auch gemessen werden (Fig. 9). Damit zeigt sich, daß die Bedeutung der IDP3 für den Stoffwechsel der Zelle in der NADPH-Bildung liegt.

5 Beschreibung der Figuren

- Fig. 1: Schema der Konstruktion des Vektors pIDPkan für den Austausch des chromosomalen *AgIDP3*-Gens gegen eine durch Deletion und Insertion des G418^R-Gens inaktive Genkopie.
- 10 Fig. 2: Überprüfung der partiellen Deletion und gleichzeitigen Insertion der Geneticin-Resistenz-Kassette am *AgIDP*-Lokus mittels Southern-Blot-Analyse. Genomische, *SphI*-gespaltene DNA wurde mit einer Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert.
- 15 Fig. 3: Vergleich der Enzymaktivitäten der NADP-spezifischen ICDH vom *Ashbya*-Wildtyp, der Mutante *A.g. ΔIDP3b* und den *AgIDP*-Überexprimierern *A.g. pAGIDP3a* und *A.g. pAGIDP3b* bei Wachstum auf Glucose-Vollmedium.
- 20 Fig. 4: Vergleich des Wachstums und der Riboflavinbildung vom *Ashbya*-Wildtyp und der Mutante *A.g. ΔIDP3b* bei Wachstum auf Sojaöl-Vollmedium.
- Fig. 5: Vergleich des Wachstums, der Riboflavinbildung und der NADP-spezifischen ICDH vom *Ashbya*-Wildtyp und den *AgIDP3*-Überexprimierern *A.g. pAGIDP3a* und *A.g. pAGIDP3b* bei Kultivierung auf Sojaöl-Vollmedium.
- 25 Fig. 6: Plasmid zur Überexpression des *AgIDP3*-Gens unter Kontrolle von *TEF*-Promotor und *TEF*-Terminator. Zur Einführung der *SphI*-Schnittstelle war eine Änderung der für die zweite Aminosäure kodierenden Nukleotidsequenz notwendig. Es wurde ein konservativer Austausch der Aminosäure Glycin in Leucin vorgenommen.
- 30

5

Fig. 7: Abbauwege ungesättigter Fettsäuren mit Doppelbindungen an geraden (A) und ungeraden (B, C) C-Atomen in Peroxisomen nach Henke *et al.* (1998).

10 Fig. 8 Trennung von aus *Ashbya*-Wildtyp isolierten Organellen im Percoll-Dichtegradienten:

Aktivitäten [U/ml] der Markerenzyme Katalase (Peroxisomen) und Fumarase (Mitochondrien), der NAD- und der NADP-spezifischen ICDH und der für den Abbau ungesättigter Fettsäuren notwendigen 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase und Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase

15

Fig. 9: Vergleich des radialen Wachstums von *Asbya*-Wildtyp, der Mutanten *A.g.* $\Delta IDP3a$ und *A.g.* $\Delta IDP3b$ und den Überexprimierern *A.g.* pAGIDP3a und *A.g.* pAGIDP3b auf verschiedene Fettsäuren (A: 18:1 cis9; b: 18:2 cis9,12; C: 18:3 cis9,12,15).

20

Fig. 10: Verteilung der Enzyme Katalase und ICDH im Percoll-Dichtegradienten nach Zentrifugation von Organellen aus Myzel des Wildtyps (A) und der Mutante *A.g.* $\Delta IDP3b$ (B).

25

Beschreibung der Sequenz

30

Nukleotidsequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des für die peroxisomale NADP-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase codierenden *AgIDP3*-Gens aus *A. gossypii*.

35

5 Ansprüche

1. Ein- oder mehrzelliger Organismus, insbesondere Mikroorganismus, zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin,
dadurch gekennzeichnet, daß dessen Enzymaktivität bezüglich
10 der NAD(P)H-Bildung höher ist als diejenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.
2. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß er eine erhöhte Isocitrat-
15 Dehydrogenase-Aktivität aufweist.
3. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach einem der Ansprüche 1
oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß er ein Pilz ist.
20
4. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis
3,
dadurch gekennzeichnet, daß er ein Pilz aus der Gattung *Ashbya*
ist.
25
5. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis
4,
dadurch gekennzeichnet, daß er ein Pilz der Spezies *Ashbya*
gossypii ist.
30
6. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen mit einer für die in Fig. 11
angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariation
kodierenden Nukleotidsequenz.

- 5 7. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach Anspruch 6 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1 bis 1262 gem. der Fig. 11 oder einer im wesentlichen gleich wirkenden DNA-Sequenz.
- 10 8. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 oder 7 mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz mit Nukleotid -661 bis -1 gem. der Fig. 11 oder einer im wesentlichen gleich wirkenden DNA-Sequenz.
- 15 9. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8 mit diesem zugeordneten regulatorischen Gensequenzen.
- 20 10. Gen-Struktur enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9.
- 25 11. Vektor enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 oder eine Gen-Struktur nach Anspruch 10.
12. Transformierter Organismus zur Herstellung von Riboflavin enthaltend in replizierbarer Form ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 oder eine Gen-Struktur nach Anspruch 10.
13. Transformierter Organismus nach Anspruch 12 enthaltend einen Vektor nach Anspruch 11.
- 30 14. Verfahren zur Herstellung von Riboflavin, dadurch gekennzeichnet, daß ein Organismus gem. einem der Ansprüche 1 bis 5 eingesetzt wird.

- 5 15. Verfahren zur Herstellung eines Riboflavin produzierenden ein- oder mehrzelligen Organismus,
dadurch gekennzeichnet, daß er so verändert wird, daß dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H-Bildung höher ist als derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung des Organismus mittels gentechnischer Methoden erfolgt.
- 15 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16,
dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung des Organismus durch Austausch des Promotors und/oder Erhöhung der Genkopienzahl erzielt wird.
- 20 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17,
dadurch gekennzeichnet, daß durch die Änderung des endogenen Isocitrat-Dehydrogenase-Gens ein Enzym mit erhöhter Aktivität erzeugt wird.
- 25 19. Verwendung des Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 12 und 13 zur Herstellung von Riboflavin.
- 30 20. Verwendung des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens nach einem der Ansprüche 6 bis 9 und der Gen-Struktur nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 12 und 13.
21. Verwendung des Vektors nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 12 und 13.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen ein- oder mehrzelligen Organismus, insbesondere Mikroorganismus, zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin wobei dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H-Bildung höher ist als derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.

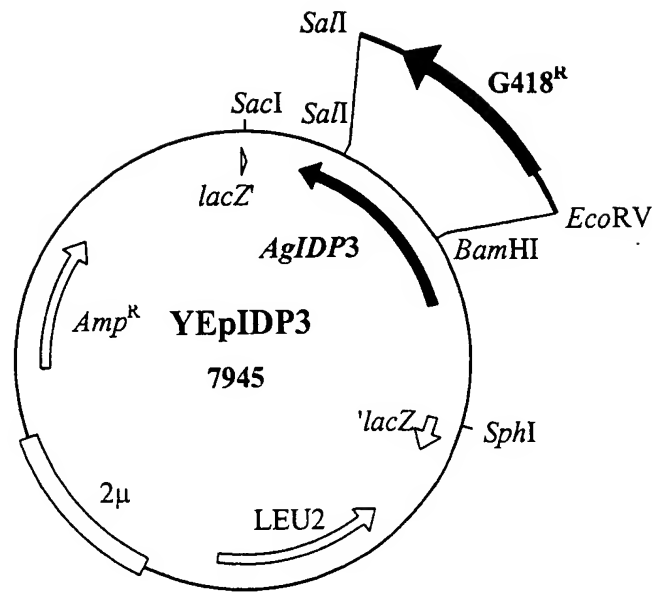


Fig. 1

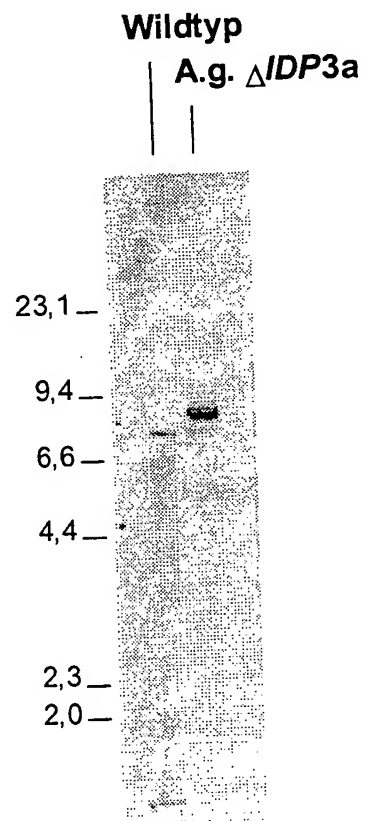


Fig. 2

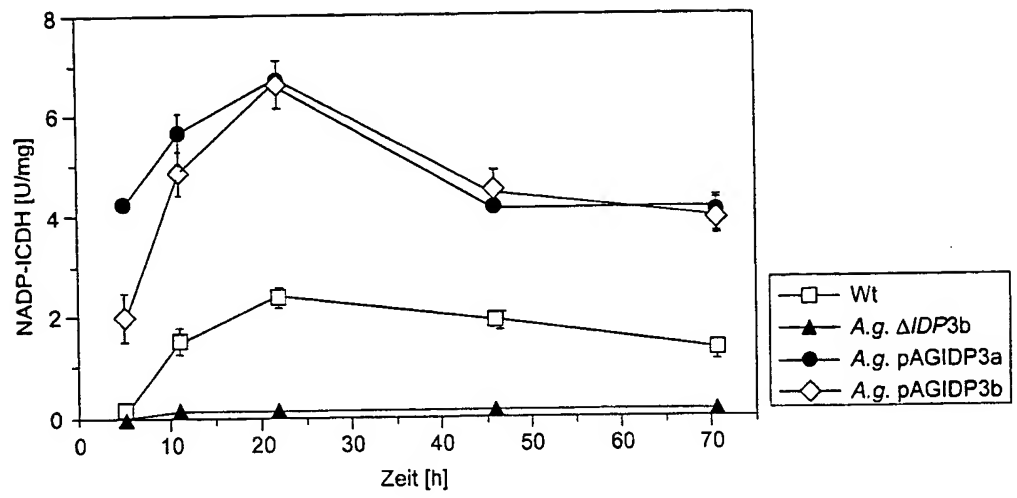


Fig. 3

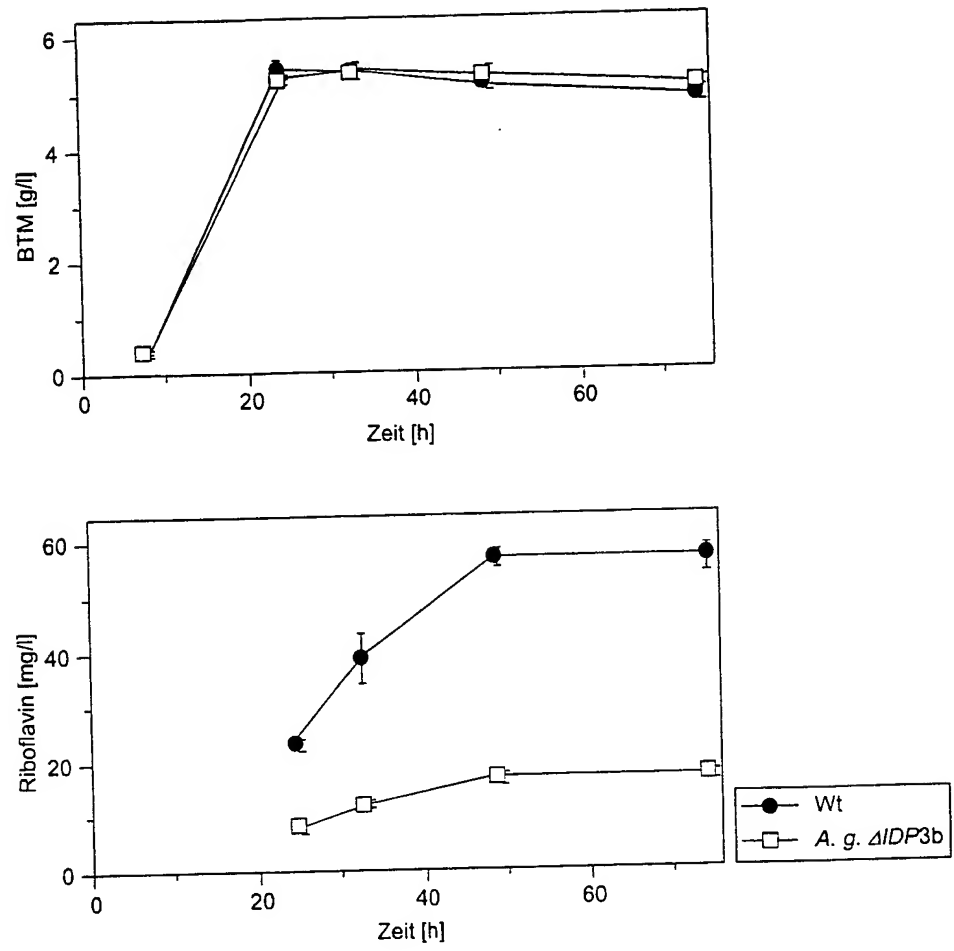


Fig. 4

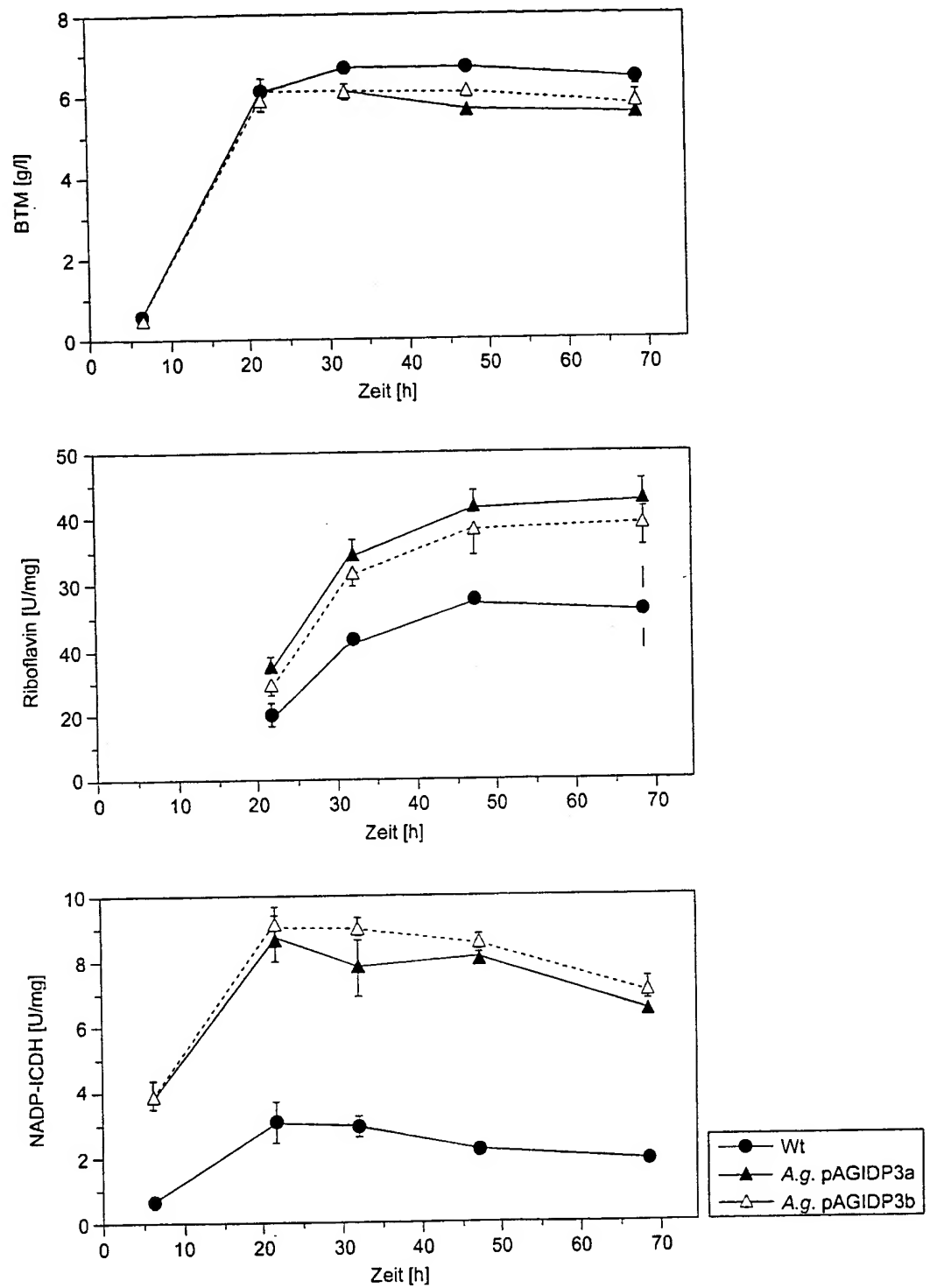


Fig. 5

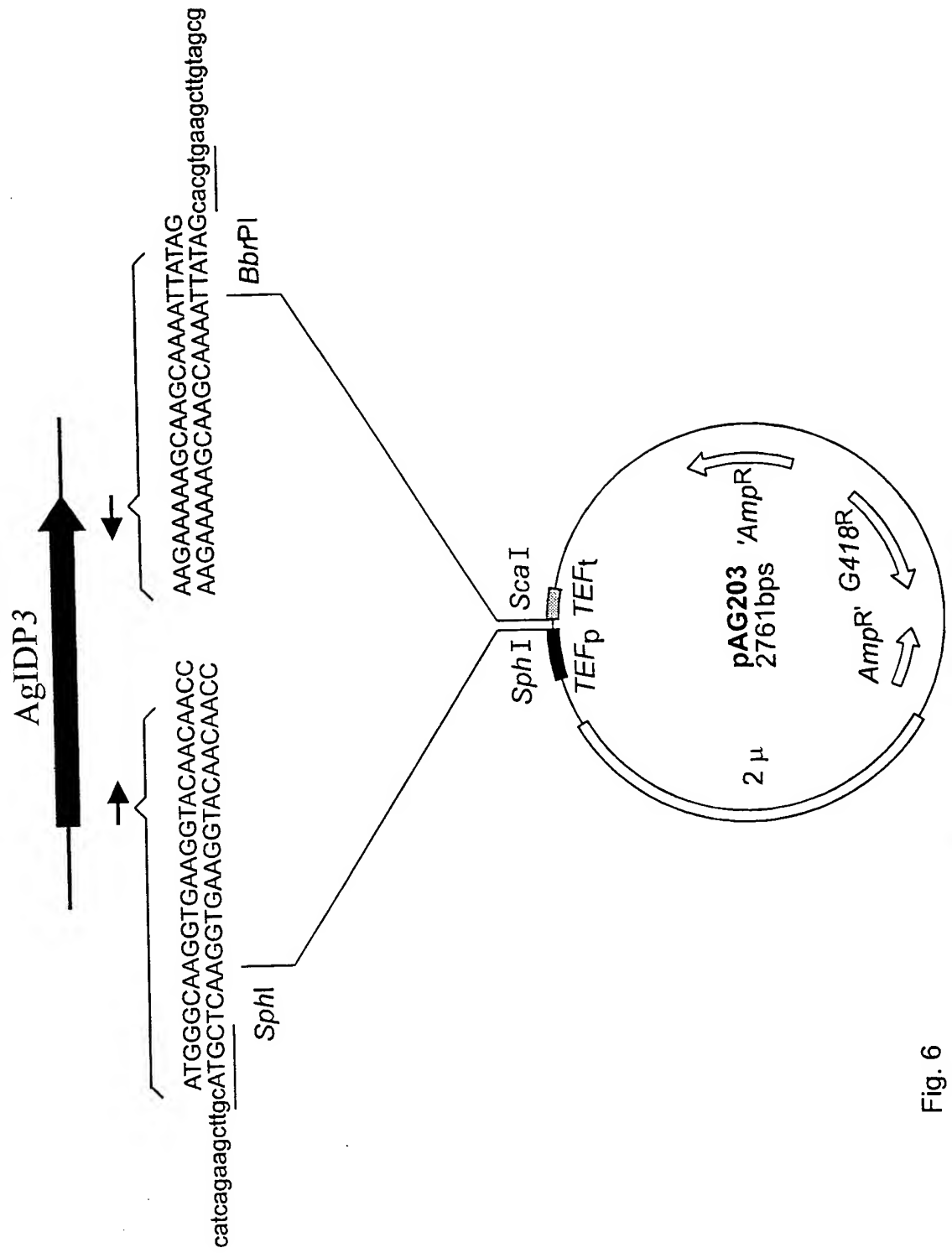


Fig. 6

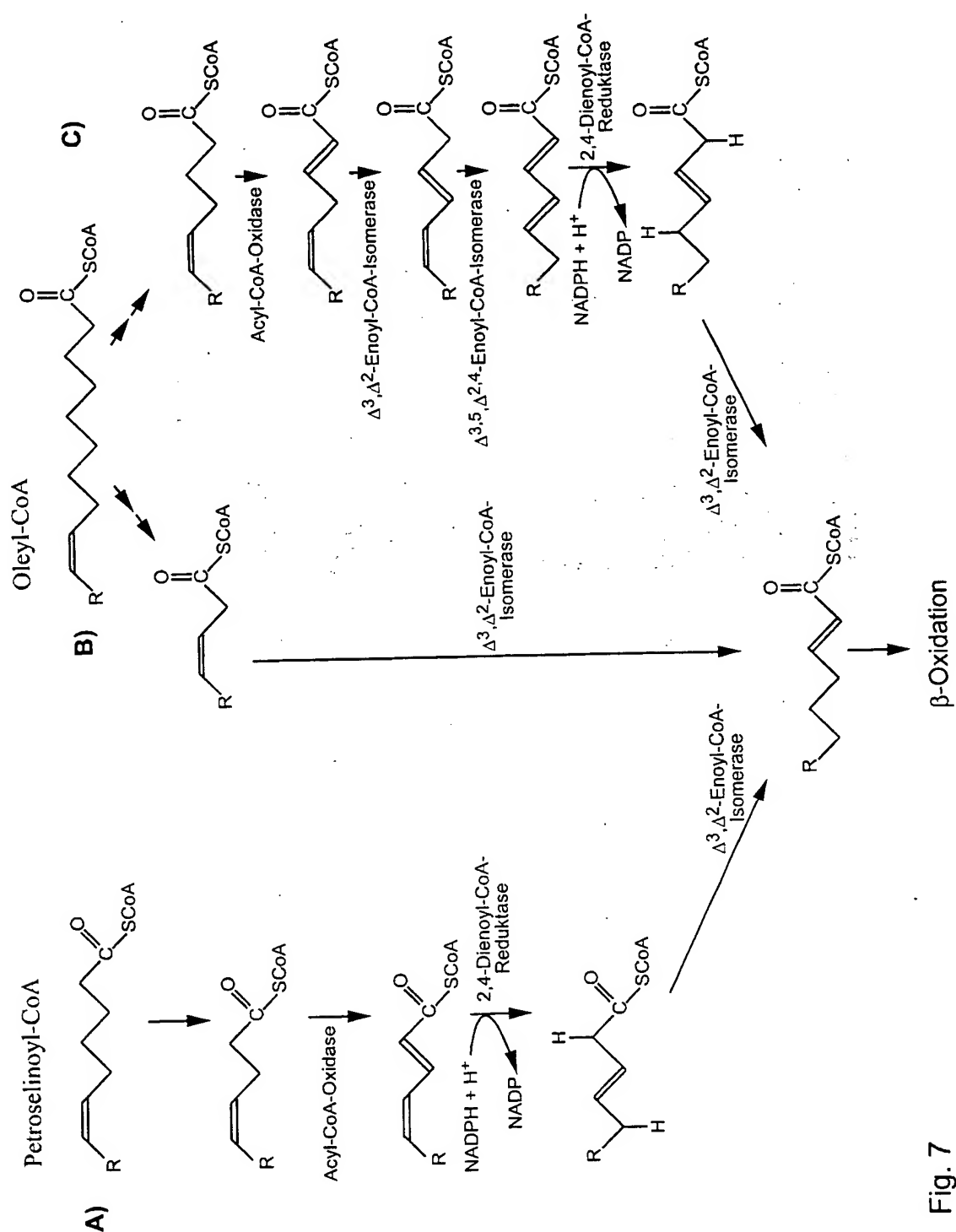


Fig. 7

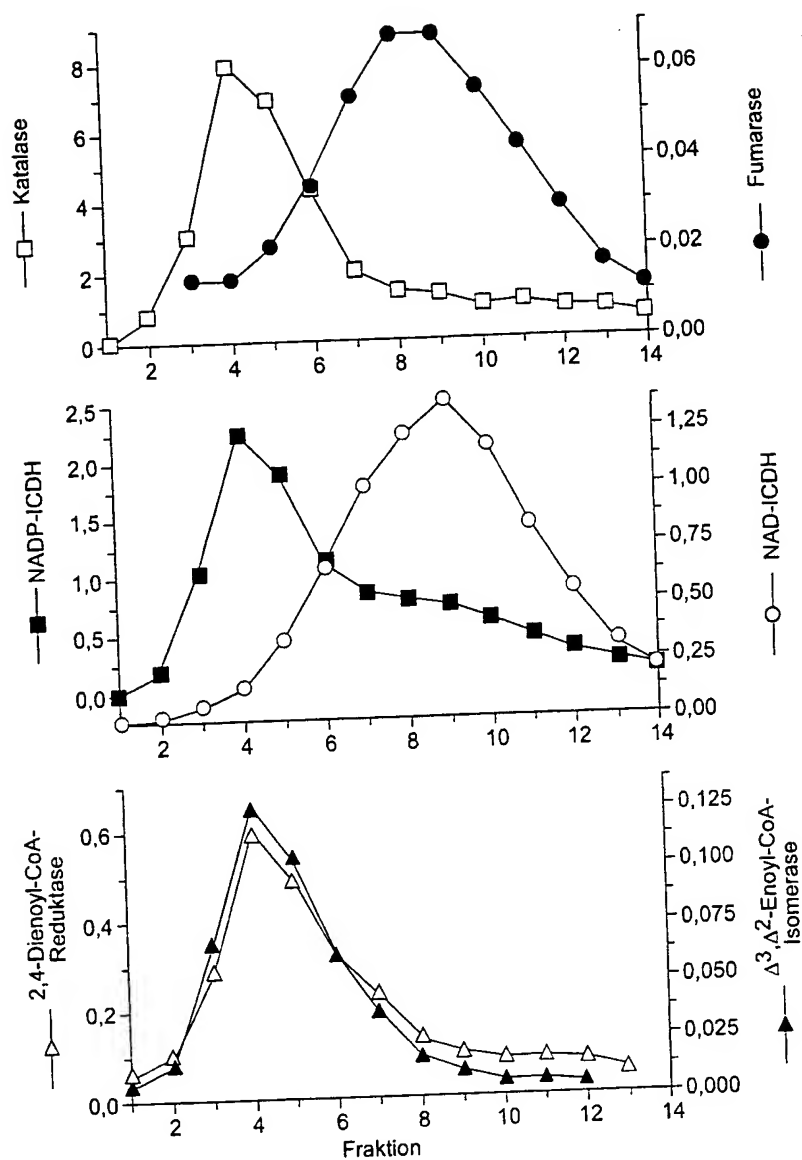


Fig. 8

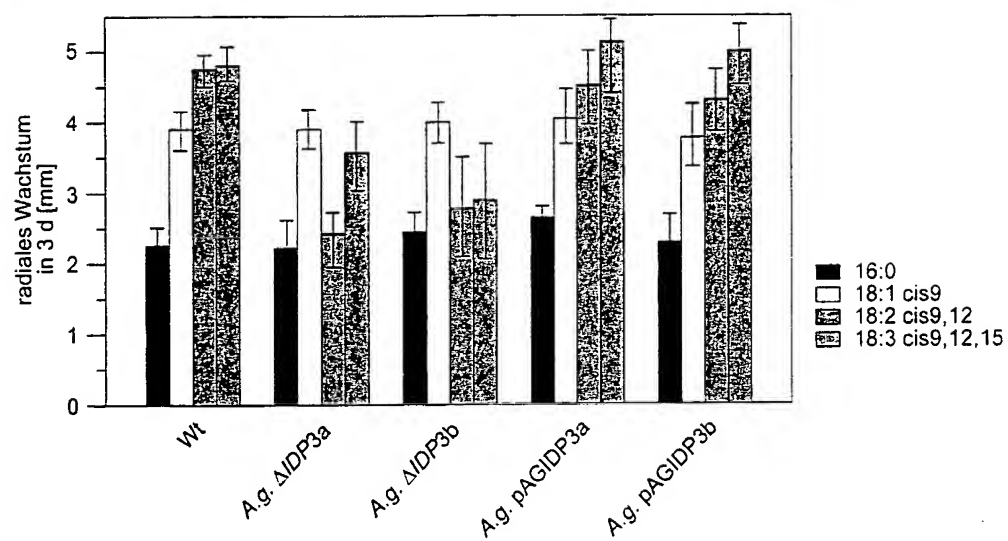
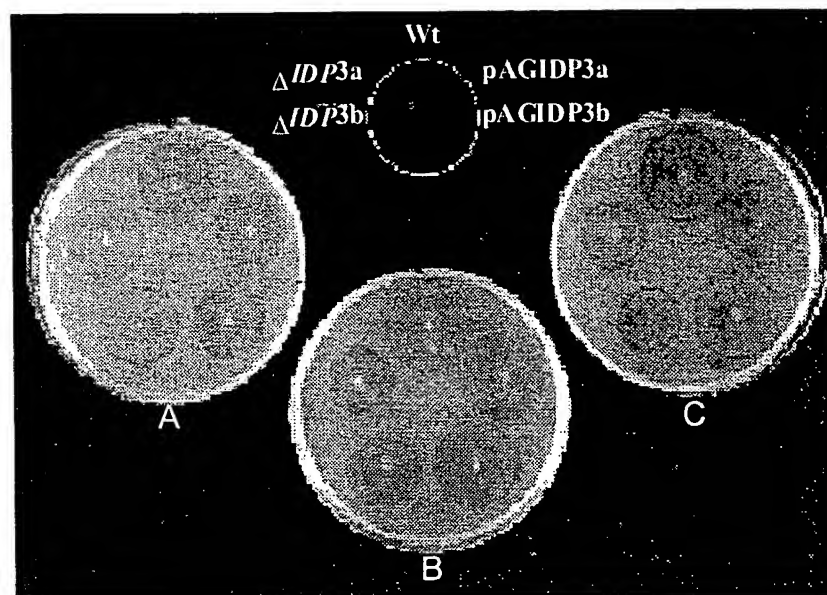


Fig. 9

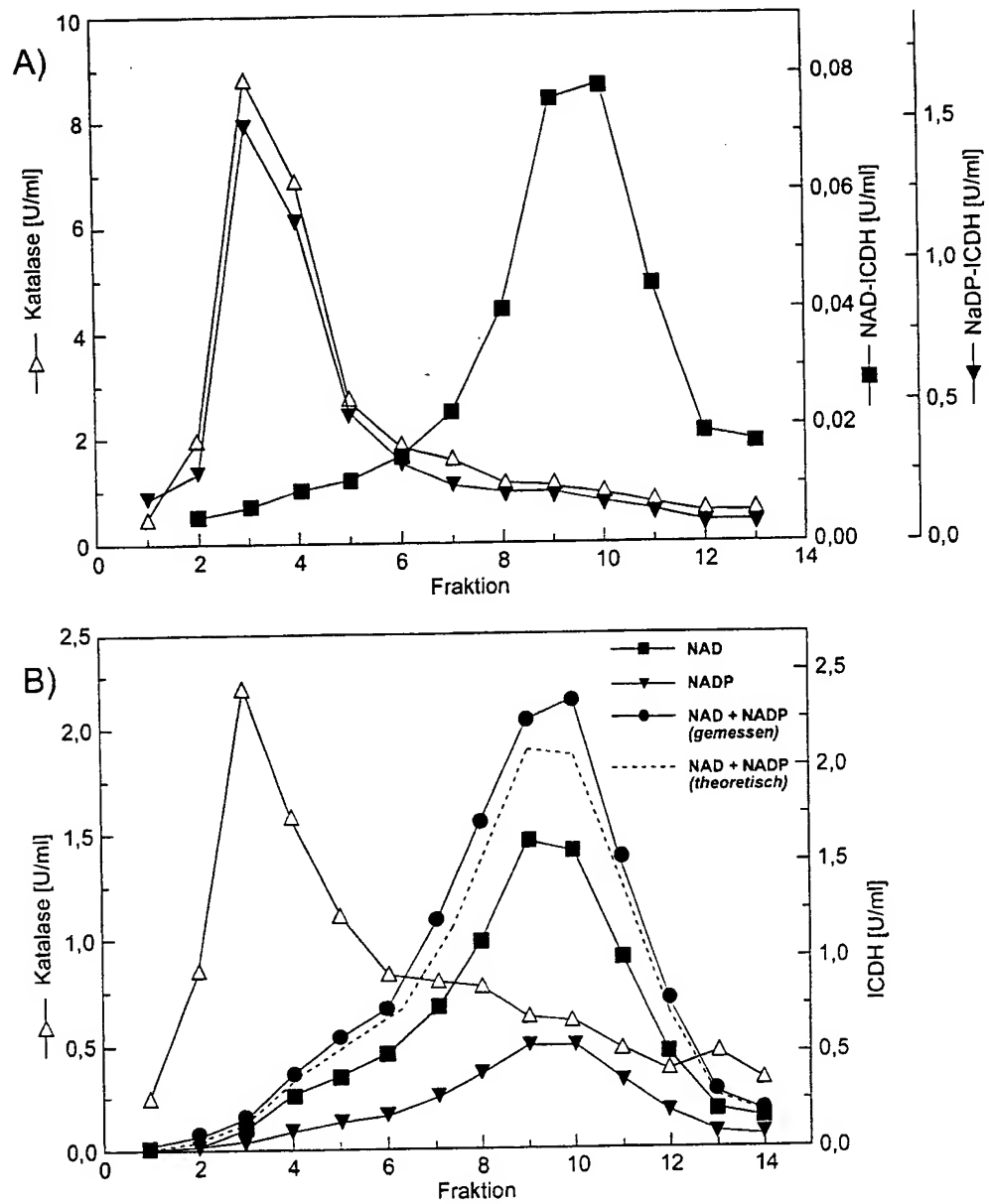


Fig. 10

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF AG, Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> Ein- oder mehrzellige Organismen zur Herstellung von
Riboflavin

<130> FZJ9909PCT

<140> PCT/EP00/07370

<141> 2000-07-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2321

<212> DNA

<213> Pilz der Spezies Ashbya Gossypii

<220>

<221> CDS

<222> (718)..(1266)

<400> 1

ctgcagcaaa tcgaggtgat cgccaacgag gtggacgtgc ggcaggacgg gacctggtgc 60
atccggtacc ggcacgagtc cgagcacggg caccacaagt cgcggtcgat cgcggcgtgc 120
aagcagcgct ggcaacacct cgagcccgcg ccggtgtatt tctactgcgg cgatgggatac 180
agcgacctga gcgctgcgaa ggaatgcgac ctgctgtttg cgaagagtgg caaggacctg 240
atctccttct gcaagaagca ggacgttccg ttccgcgagt tcaacacttt tgacgatgtg 300
ctgagcgagg tcaagcgagt ggtggcgggc gaggcctctg tcacggaact ccaggggggc 360
tccgctgcgt aagcactgtc tgcacagtg accttggcgg tagctgcgat ttgtaactac 420
ctacgtaatt agtcctgtc gcgctgcggt ccagtgttag gcacgcccc catgaaaggc 480
agccgtaagc aattagtaac ggccctagtag ggctccgatg tatgtgctag cacatgacag 540
cccaacgggt tgagaagtcc ggctcgaatc atttccgcgc cgagtgggtc gtgggtggag 600
ccgcccgaac ccttgtcagc gcgggcagtt ggatataagg cagtggttgt agcaaaagtg 660
agXtgctgca tttcacgaag ccgagcgcaa caacgcacag acatcagtaa gcagct atg 720
Met
1

ggc aag gtg aag gta caa caa ccc atc gtc gag atg gac ggc gac gaa 768
Gly Lys Val Lys Val Gln Gln Pro Ile Val Glu Met Asp Gly Asp Glu
5 10 15

cag acg cgg atc atc tgg cac ttg atc aag gat cag ctc atc ttc ccc 816
Gln Thr Arg Ile Ile Trp His Leu Ile Lys Asp Gln Leu Ile Phe Pro
20 25 30

tac ttg gac gtg gac ttg aag tac tac gat ctt tcc att gag aac agg 864
 Tyr Leu Asp Val Asp Leu Lys Tyr Tyr Asp Leu Ser Ile Glu Asn Arg
 35 40 45

gat gcc acc gag gac cgc gtg act gtg gag tct gcg gag gcg acc ctc 912
 Asp Ala Thr Glu Asp Arg Val Thr Val Glu Ser Ala Glu Ala Thr Leu
 50 55 60 65

aag tac ggc gtt gcc gtc aag tgt gcg att att acc ccg gac gag gcg 960
 Lys Tyr Gly Val Ala Val Lys Cys Ala Ile Ile Thr Pro Asp Glu Ala
 70 75 80

cgt gtc gag gag ttc ggg ctc aag gag atg tgg aag tct ccc aac ggg 1008
 Arg Val Glu Glu Phe Gly Leu Lys Glu Met Trp Lys Ser Pro Asn Gly
 85 90 95

acc atc cgg aac atc ctc ggc ggg acc gtc ttc aga gag ccc att att 1056
 Thr Ile Arg Asn Ile Leu Gly Gly Thr Val Phe Arg Glu Pro Ile Ile
 100 105 110

atc cca agg atc ccc aga ctg gtg ccc ggc tgg aac gag ccg atc att 1104
 Ile Pro Arg Ile Pro Arg Leu Val Pro Gly Trp Asn Glu Pro Ile Ile
 115 120 125

gtc ggc aga cac gcg ttt ggg gac cag tac aag gcg acc gac gtt gtc 1152
 Val Gly Arg His Ala Phe Gly Asp Gln Tyr Lys Ala Thr Asp Val Val
 130 135 140 145

att cca ggc gag ggc acg ttg aag ctg gtc ttt gaa agc aag gac ggg 1200
 Ile Pro Gly Glu Gly Thr Leu Lys Leu Val Phe Glu Ser Lys Asp Gly
 150 155 160

gac aag tcc aag aat ctt gac ctg gag ttc ttt gaa tac ccc aag gat 1248
 Asp Lys Ser Lys Asn Leu Asp Leu Glu Phe Phe Glu Tyr Pro Lys Asp
 165 170 175

ggc ggt gtt gcc atg acc atgtactaca ccaccgactc gatcaccggc 1296
 Gly Gly Val Ala Met Thr
 180

tttgccaaagt cgagcttcga gttggcgcttg caaagaaaga tgccgctata ttcgacaacg 1356
 aagaacacga tcttgaagaa gtacgacggc aagttaaagg atattttcga gggcatgtac 1416
 ccagcggagt acaaggagaa gtttgaggct gctggcatct ggtatgaaca cagactgatt 1476
 gacgatatgg ttgcgcagat gttgaagtcc aagggcggct tcatcattgc catgaagaac 1536
 tacgatggtg atgtgcagtc ggacatcgtc gccagggct tcgggtcttt ggggtctcatg 1596
 acttctgttc ttgtgtctcc agatggaaag accttcgaga gtgaggccgc acatggcact 1656
 gtcacccggc actacagaca gcaccagcag ggcaaggaaa catccaccaa ctctattgcc 1716
 tctatttttg cctggatgcg cggattata cacagagga aggtcgacgg taccacagat 1776
 gtcgtgaagt tcggcgagtt gttggagaag tccaccctgg acacgggtgca ggaggacatc 1836
 atgaccaagg acctagcgtt gattttgggc aagaccgaca gagccagcta tgttaccacg 1896

gaagagttta tcacagcagt agcgaaccgc ttagcgatgg ctacaagcgt cttttttgtg 1956
 aataagaaaa agcaagcaaa attatagcct aggctgcctg tagcgtctat ttattactag 2016
 tctagcatat ctagcacaag aatataagata ctgagccatc cgcccaggat tacagtcagg 2076
 attccaactt gtaaacctcc ggtggtgctg actcgccgca aattaggtga gcttgccatt 2136
 agtcacccga ggcgcagaat gagtaggggtt tatagtaaac cggggtgctg taacaccaga 2196
 tcccactttt cctggcacag tatttttggc gacaacggca ctgctaaccg tttctcaact 2256
 acgcgcaata atgtaggtcg cacgggtccga tgaaaactaa tgcgcgtag catgacatgg 2316
 aattc 2321

<210> 2
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Pilz der Spezies Ashbya Gossypii

<400> 2
 Met Gly Lys Val Lys Val Gln Gln Pro Ile Val Glu Met Asp Gly Asp 15
 1 5 10
 Glu Gln Thr Arg Ile Ile Trp His Leu Ile Lys Asp Gln Leu Ile Phe 30
 20 25 30
 Pro Tyr Leu Asp Val Asp Leu Lys Tyr Tyr Asp Leu Ser Ile Glu Asn 45
 35 40 45
 Arg Asp Ala Thr Glu Asp Arg Val Thr Val Glu Ser Ala Glu Ala Thr 60
 50 55 60
 Leu Lys Tyr Gly Val Ala Val Lys Cys Ala Ile Ile Thr Pro Asp Glu 80
 65 70 75
 Ala Arg Val Glu Glu Phe Gly Leu Lys Glu Met Trp Lys Ser Pro Asn 95
 85 90 95
 Gly Thr Ile Arg Asn Ile Leu Gly Gly Thr Val Phe Arg Glu Pro Ile 110
 100 105 110
 Ile Ile Pro Arg Ile Pro Arg Leu Val Pro Gly Trp Asn Glu Pro Ile 125
 115 120 125
 Ile Val Gly Arg His Ala Phe Gly Asp Gln Tyr Lys Ala Thr Asp Val 140
 130 135 140
 Val Ile Pro Gly Glu Gly Thr Leu Lys Leu Val Phe Glu Ser Lys Asp 160
 145 150 155 160
 Gly Asp Lys Ser Lys Asn Leu Asp Leu Glu Phe Phe Glu Tyr Pro Lys 175
 165 170 175
 Asp Gly Gly Val Ala Met Thr 180

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/11052 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53,
15/80, 9/04, 1/15, C12P 25/00 // (C12N 1/15, C12R 1:645)

20, D-52428 Jülich (DE). MAETING, Ines [DE/DE];
Wiesenstr. 3, D-52428 Jülich (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07370

(74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Lintorfer Strasse 10, D-40878
Ratingen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Juli 2000 (31.07.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 37 548.8 9. August 1999 (09.08.1999) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
D-67056 Ludwigshafen (DE). FORSCHUNGSZEN-
TRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; D-52425 Jülich (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): ALTHÖFER, Hen-
ning [DE/DE]; Mainstrasse 12, D-67117 Limburgerhof
(DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Rossmarktstrasse
27, D-67346 Speyer (DE). REVUELTA DOVAL, Jose
L. [ES/ES]; Grillo 11 4E, E-37001 Salamanca (ES).
SANTOS GARCIA, Maria Angeles [ES/ES]; C/Escue-
las, 1-5, E-37001 Salamanca (ES). SAHM, Hermann
[DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE).
STAHMANN, Klaus-Peter [DE/DE]; Wilhelmstrasse

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/11052 A2

(54) Title: MONOCELLULAR OR MULTICELLULAR ORGANISMS FOR THE PRODUCTION OF RIBOFLAVIN

(54) Bezeichnung: EIN- ODER MEHRZELLIGE ORGANISMEN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN

(57) Abstract: The invention relates to a monocellular or multicellular organism, especially a microorganism, for biotechnological production of riboflavin, whereby the enzymatic activity thereof with respect to NAD(P)H formation is higher than that of a wild type of species *Ashbya gossypii* ATCC10895.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft einen ein- oder mehrzelligen Organismus, insbesondere Mikroorganis-
mus, zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin, wobei dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H Bildung höher ist als
derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.



5 Ein- oder mehrzellige Organismen zur Herstellung von Riboflavin

Die vorliegende Erfindung betrifft einen ein- oder mehrzelligen Organismus zur Herstellung von Riboflavin.

- 10 Das Vitamin B₂, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier essentiell. Bei Vitamin-B₂-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, Risse in den Mundwinkeln, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten u. a. Hautschäden, Bindehautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei
- 15 Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme eintreten. Das Vitamin B₂ hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminpräparat bei Vitaminmangel sowie als Futtermittelzusatz. Daneben wird es auch als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc., eingesetzt.

20

- Die Herstellung von Riboflavin erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell. Bei den chemischen Herstellungsverfahren wird das Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei allerdings auch relativ kostspielige Ausgangsprodukte – wie beispielsweise D-Ribose – eingesetzt werden müssen.
- 25

- Eine Alternative zur chemischen Herstellung des Riboflavins bietet die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Die mikrobielle Herstellung des Riboflavins eignet sich insbesondere für solche Fälle, in denen eine hohe Reinheit dieser Substanz nicht erforderlich ist. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn das Riboflavin als Zusatz zu Futtermittelprodukten eingesetzt werden soll. In solchen Fällen hat die mikrobielle Herstellung des Riboflavins den Vorteil, daß diese Substanz in einem einstufigen Prozeß gewinnbar ist. Auch können als
- 30

- 5 Ausgangsprodukte für die mikrobielle Synthese nachwachsende Rohstoffe, wie beispielsweise pflanzliche Öle, eingesetzt werden.

Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Ashbya gossypii* oder *Eremothecium ashbyi* ist bekannt (The Merck Index,
10 Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983, A. Bacher, F. Lingens, *Angew. Chem.* 1969, S. 393); aber auch Hefen, wie z.B. *Candida* oder *Saccharomyces*, und Bakterien wie *Clostridium*, *Bacillus* und *Corynebakterium* sind zur Riboflavinproduktion geeignet.

- 15 Zudem sind Verfahren mit der Hefe *Candida famata* beispielsweise in der US 05231007 beschrieben.

Riboflavin-überproduzierende Bakterienstämme sind beispielsweise in der EP 405370 beschrieben, wobei die Stämme durch Transformation der
20 Riboflavin- Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden. Diese Prokaryonten-Gene waren aber für ein rekombinantes Riboflavin-Herstellungsverfahren mit Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Ashbya gossypii* ungeeignet. Daher wurden gemäß der WO 93/03183 für die Riboflavin-Biosynthese spezifische Gene aus einem
25 Eukaryonten, nämlich aus *Saccharomyces cerevisiae*, isoliert, um damit ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin in einem eukaryontischen Produktionsorganismus bereitzustellen. Derartige rekombinante Herstellungsverfahren haben für die Riboflavin-Produktion jedoch dann keinen oder nur begrenzten Erfolg, wenn die Bereitstellung
30 von Substrat für die an der Riboflavin-Biosynthese spezifisch beteiligten Enzyme unzureichend ist.

1967 fand Hanson (Hanson AM, 1967, in *Microbial Technology*, Peppler, HJ, pp.222-250 New York), daß der Zusatz der Aminosäure Glycin die
35 Riboflavin-Bildung von *Ashbya gossypii* steigert. Ein derartiges Verfahren

- 5 ist jedoch nachteilig, weil Glycin ein sehr teurer Rohstoff ist. Aus diesem Grunde war man bestrebt, durch Herstellung von Mutanten die Riboflavin-Produktion zu optimieren.

10 Aus der DE 19545468.5 A1 ist ein weiteres Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin bekannt, bei dem die Isocitratlyase-Aktivität oder die Isocitratlyase-Genexpression eines Riboflavin produzierenden Mikroorganismus erhöht ist. Darüber hinaus ist aus der DE 19840709 A1 ein ein- oder mehrzelliger Organismus insbesondere ein Mikroorganismus zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin bekannt. Dieser zeichnet
15 sich dadurch aus, daß einen derart veränderten Glycinstoffwechsel aufweist, daß seine Riboflavinsyntheseleistung ohne externe Zufuhr von Glycin mindestens gleich derjenigen eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10892 ist.

- 20 Aber auch im Vergleich zu diesen Verfahren besteht noch ein Bedarf zu einer weiteren Optimierung der Riboflavin-Herstellung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demgemäß, einen ein- oder mehrzelligen Organismus, vorzugsweise einen Mikroorganismus, für die
25 biotechnische Herstellung von Riboflavin zur Verfügung zu stellen, der eine weitere Optimierung der Riboflavin-Bildung ermöglicht. Insbesondere sollte ein Organismus zur Verfügung gestellt werden, der eine Produktion ermöglicht, die gegenüber dem bisherigen Stand der Technik wirtschaftlicher ist. Vor allem soll der Organismus eine im Vergleich zu den
30 bisherigen Organismen erhöhte Riboflavin-Bildung erlauben.

Diese Aufgabe wird durch einen ein- oder mehrzelligen Organismus gelöst, dessen Enzymaktivität der bezüglich NAD(P)H-Bildung höher ist als derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.

35

5 Das Ziel einer beschleunigten intrazellulären NAD(P)H-Versorgung kann durch Erhöhung der Aktivität eines NAD(P)H-bildenden bzw. Senkung der Aktivität eines NAD(P)H verbrauchenden Enzyms bzw. eine Änderung der Spezifität erreicht werden. Dies läßt sich mit den bekannten Methoden der Stammverbesserung von Organismen erreicht werden. D. h. im
10 einfachsten Falle lassen sich entsprechende Stämme nach der in der Mikrobiologie üblichen Selektion mittels Screening herstellen. Ebenso ist die Mutation mit anschließender Selektion einsetzbar. Die Mutation kann hierbei sowohl mittels chemischer als auch mittels physikalischer Mutagenese ausgeführt werden. Eine weitere Methode ist die Selektion
15 und Mutation mit anschließender Rekombination. Schließlich lassen sich die erfindungsgemäßen Organismen mittels Genmanipulation herstellen.

Erfindungsgemäß wird der Organismus derart verändert, daß er intrazellulär NAD(P)H in einer Menge erzeugt, die größer als sein Bedarf
20 für die Aufrechterhaltung seines Metabolismus ist. Diese Erhöhung der intrazellulären NAD(P)H-Erzeugung läßt sich erfindungsgemäß vorzugsweise dadurch erreichen, daß ein Organismus hergestellt wird, bei dem die Enzymaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase erhöht ist. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, daß durch Veränderung des
25 katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikation oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren,
30 hervorgerufen werden.

Die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität kann erfindungsgemäß vorzugsweise durch Mutation des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens erhöht werden. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen
35 Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-

- 5 Bestrahlung oder mutationsauslösende Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden, wie Deletion, Insertion und/oder Nukleotid-Austausch.

Die Isocitrat-Dehydrogenase-Genexpression kann durch Einbau von
10 Isocitrat-Dehydrogenase-Genkopien und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Isocitrat-Dehydrogenase-Genexpression positiv beeinflussen, erreicht werden. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf Transcriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transcriptionssignale erhöht werden. Daneben ist
15 aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl kann beispielsweise das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut
20 werden, der vorzugsweise dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält, insbesondere solche, die die Genexpression verstärken. Anschließend wird ein Riboflavin-produzierender Mikroorganismus, mit dem das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen enthaltenden Genkonstrukt transformiert.

25 Erfindungsgemäß kann die Überexpression der Isocitrat-Dehydrogenase auch durch Austausch des Promotors erzielt werden. Hierbei ist es möglich, die höhere enzymatische Aktivität alternativ durch Einbau von Genkopien oder durch Austausch des Promotors zu erzielen.
30 Gleichmaßen ist es jedoch auch möglich, durch gleichzeitigen Austausch des Promotors und Einbau von Genkopien die gewünschte Änderung der Enzymaktivität zu erzielen.

Die Veränderung des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens führt zu einer
35 beschleunigten NAD(P)H-Bildung und zugleich zu einer überraschend

- 5 hohen Steigerung der Riboflavin-Bildung, wie sie bisher nicht erreichbar war.

Das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen wird vorzugsweise aus Mikroorganismen, besonders bevorzugt aus Pilzen, isoliert. Dabei sind
10 Pilze der Gattung *Ashbya* wiederum bevorzugt. Höchst bevorzugt ist die Spezies *Ashbya gossypii*.

Für die Isolierung des Gens kommen aber auch alle weiteren Organismen, deren Zellen die Sequenz zur Bildung der Isocitrat-Dehydrogenase
15 enthalten, also auch pflanzliche und tierische Zellen, in Betracht. Die Isolierung des Gens kann durch homologe oder heterologe Komplementation einer im Isocitrat-Dehydrogenase-Gen defekten Mutante oder auch durch heterologes Probing oder PCR mit heterologen Primern erfolgen. Zur Subklonierung kann das Insert des komplementierenden
20 Plasmids anschließend durch geeignete Schritte mit Restriktionsenzymen in der Größe minimiert werden. Nach Sequenzierung und Identifizierung des putativen Gens erfolgt eine paßgenaue Subklonierung durch PCR. Plasmide, die die so erhaltenen Fragmente als Insert tragen, werden in die Isocitrat-Dehydrogenase-Gen-Defekte Mutante eingebracht, die auf
25 Funktionalität des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens getestet wird. Funktionelle Konstrukte werden schließlich zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten eingesetzt.

Nach Isolierung und Sequenzierung sind die Isocitrat-Dehydrogenase-
30 Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die angegebene Aminosäure-Sequenz oder deren Allelvariation kodieren. Allelvariationen umfassen insbesondere Derivate, die durch Deletion, Insertion und Substitution von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität erhalten bleibt. Eine

- 5 entsprechende Sequenz ist in Figur 2b von Nukleotid 1 bis 1262 angegeben.

Den Isocitrat-Dehydrogenase-Genen ist insbesondere ein Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid -661 bis -1 gem. Fig. 11 oder eine im
10 wesentlichen gleich wirkende DNA-Sequenz vorgeschaltet. So kann beispielsweise dem Gen ein Promotor vorgeschaltet sein, der sich von dem Promotor mit der angegebenen Nukleotidsequenz durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion und/oder Deletion unterscheidet, ohne daß aber die Funktionalität bzw. die Wirksamkeit des
15 Promotors beeinträchtigt wird. Des weiteren kann der Promotor durch Veränderung seiner Sequenz in seiner Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksame Promotoren ausgetauscht werden.

Dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen können des weiteren regulatorische
20 Gen-Sequenzen bzw. Regulorgene zugeordnet sein, die insbesondere die Isocitrat-Dehydrogenase-Gen-Aktivität erhöhen. So können dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen beispielsweise sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Isocitrat-Dehydrogenase-Expression
25 bewirken.

Dem Isocitrat-Dehydrogenase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne Regulator-Gen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in
30 einer Gen-Struktur enthalten ist. Durch Klonierung des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das Isocitrat-Dehydrogenase-Gen enthalten und zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in
35 zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch

- 5 homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Bei den erfindungsgemäß erhaltenen ein- oder mehrzelligen Organismen kann es sich um beliebige für biotechnische Verfahren einsetzbare Zellen
10 handeln. Hierzu zählen beispielsweise Pilze, Hefen, Bakterien sowie pflanzliche und tierische Zellen. Erfindungsgemäß handelt es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von Pilzen, besonders bevorzugt von Pilzen der Gattung *Ashbya*. Hierbei ist die Spezies *Ashbya gossypii* besonders bevorzugt.

15

Im folgenden wird die Erfindung näher anhand von Beispielen erläutert, ohne daß damit eine Begrenzung auf den Gegenstand der Beispiele verbunden sein soll:

- 20 Das Gen der Isocitrat-Dehydrogenase (IDP3) wurde durch PCR kloniert und dann sequenziert (Sequenz siehe Fig. 11). Die gentechnisch durchgeführte partielle Deletion des Gens durch Austauschmutagenese mit einem Geneticinresistenz-Gen (Fig. 1) wurde durch Southern Blot (Fig. 2) bestätigt. Diese Disruption, d.h. Zerstörung des Gens im Genom des
25 Pilzes, führt dazu, daß der Pilz die davon kodierte Isocitrat-Dehydrogenase nicht mehr bilden kann. Fig. 3 zeigt die Abnahme der Enzymaktivität im Disruptionsstamm *AgΔDP3b* im Vergleich zum Wildtyp ATCC 10895. In Präparationen der Peroxisomen konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym in diesen Organellen lokalisiert ist (Fig. 10). Während
30 die Enzymaktivität in Wildtyp-Peroxisomen deutlich messbar ist, findet sich in den Peroxisomen des Disruptionsstamms keine Aktivität mehr.

Die Disruption des Gens führt zu einer deutlichen Verminderung der Vitaminbildung im Vergleich zum Elternstamm (Fig. 4). Wird das Gen
35 dagegen unter Steuerung des starken TEF-Promotors auf einem Plasmid

- 5 (Fig. 6) in zusätzlicher Kopie in die Ashbya-Zellen gebracht, ist ein deutlicher Anstieg in der Enzymaktivität und der Riboflavinbildung meßbar (Fig. 5).

- Fig. 7 zeigt, daß bei der Verstoffwechselung ungesättigter Fettsäuren
10 NADPH bei zwei von drei alternativen Reaktionswegen als Reduktionsmittel benötigt wird. Die darin involvierte 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase konnte in Zellen von Ashbya ebenfalls in Peroxisomen lokalisiert werden (Fig. 8). Die Disruption des IDP3-Gens sollte nun zu einem verringerten Wachstum der Zellen auf Linolsäure oder Linolensäure
15 führen. Das konnte auch gemessen werden (Fig. 9). Damit zeigt sich, daß die Bedeutung der IDP3 für den Stoffwechsel der Zelle in der NADPH-Bildung liegt.

5 Beschreibung der Figuren

- Fig. 1: Schema der Konstruktion des Vektors pIDPkan für den Genaustausch des chromosomalen *AgIDP3*-Gens gegen eine durch Deletion und Insertion des G418^R-Gens inaktive Genkopie.
- 10 Fig. 2: Überprüfung der partiellen Deletion und gleichzeitigen Insertion der Geneticin-Resistenz-Kassette am *AgIDP*-Lokus mittels Southern-Blot-Analyse. Genomische, *SphI*-gespaltene DNA wurde mit einer Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert.
- 15 Fig. 3: Vergleich der Enzymaktivitäten der NADP-spezifischen ICDH vom *Ashbya*-Wildtyp, der Mutante *A.g. ΔIDP3b* und den *AgIDP*-Überexprimierern *A.g. pAGIDP3a* und *A.g. pAGIDP3b* bei Wachstum auf Glucose-Vollmedium.
- 20 Fig. 4: Vergleich des Wachstums und der Riboflavinbildung vom *Ashbya*-Wildtyp und der Mutante *A.g. ΔIDP3b* bei Wachstum auf Sojaöl-Vollmedium.
- Fig. 5: Vergleich des Wachstums, der Riboflavinbildung und der NADP-spezifischen ICDH vom *Ashbya*-Wildtyp und den *AgIDP3*-Überexprimierern *A.g. pAGIDP3a* und *A.g. pAGIDP3b* bei Kultivierung auf Sojaöl-Vollmedium.
- 25 Fig. 6: Plasmid zur Überexpression des *AgIDP3*-Gens unter Kontrolle von *TEF*-Promotor und *TEF*-Terminator. Zur Einführung der *SphI*-Schnittstelle war eine Änderung der für die zweite Aminosäure kodierenden Nukleotidsequenz notwendig. Es wurde ein konservativer Austausch der Aminosäure Glycin in Leucin vorgenommen.
- 30

5

Fig. 7: Abbauwege ungesättigter Fettsäuren mit Doppelbindungen an geraden (A) und ungeraden (B, C) C-Atomen in Peroxisomen nach Henke *et al.* (1998).

10

Fig. 8 Trennung von aus *Ashbya*-Wildtyp isolierten Organellen im Percoll-Dichtegradienten:

Aktivitäten [U/ml] der Markerenzyme Katalase (Peroxisomen) und Fumarase (Mitochondrien), der NAD- und der NADP-spezifischen ICDH und der für den Abbau ungesättigter Fettsäuren notwendigen 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase und Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase

15

Fig. 9: Vergleich des radialen Wachstums von *Asbya*-Wildtyp, der Mutanten *A.g. $\Delta IDP3a$* und *A.g. $\Delta IDP3b$* und den Überexprimierern *A.g. pAGIDP3a* und *A.g. pAGIDP3b* auf verschiedene Fettsäuren (A: 18:1 cis9; b: 18:2 cis9,12; C: 18:3 cis9,12,15).

20

Fig. 10: Verteilung der Enzyme Katalase und ICDH im Percoll-Dichtegradienten nach Zentrifugation von Organellen aus Myzel des Wildtyps (A) und der Mutante *A.g. $\Delta IDP3b$* (B).

25

Beschreibung der Sequenz

30

Nukleotidsequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des für die peroxisomale NADP-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase codierenden *AgIDP3*-Gens aus *A. gossypii*.

35

5 Ansprüche

1. Ein- oder mehrzelliger Organismus, insbesondere Mikroorganismus, zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin,
10 **dadurch gekennzeichnet, daß** dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H-Bildung höher ist als diejenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.
2. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach Anspruch 1,
15 **dadurch gekennzeichnet, daß** er eine erhöhte Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität aufweist.
3. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
20 **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Pilz ist.
4. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
25 **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Pilz aus der Gattung *Ashbya* ist.
5. Ein- oder mehrzelliger Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
30 **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Pilz der Spezies *Ashbya gossypii* ist.
6. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen mit einer für die in Fig. 11 angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariation kodierenden Nukleotidsequenz.

- 5 7. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach Anspruch 6 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1 bis 1262 gem. der Fig. 11 oder einer im wesentlichen gleich wirkenden DNA-Sequenz.
- 10 8. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 oder 7 mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz mit Nukleotid -661 bis -1 gem. der Fig. 11 oder einer im wesentlichen gleich wirkenden DNA-Sequenz.
- 15 9. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8 mit diesem zugeordneten regulatorischen Gensequenzen.
10. Gen-Struktur enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9.
- 20 11. Vektor enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 oder eine Gen-Struktur nach Anspruch 10.
- 25 12. Transformierter Organismus zur Herstellung von Riboflavin enthaltend in replizierbarer Form ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 oder eine Gen-Struktur nach Anspruch 10.
13. Transformierter Organismus nach Anspruch 12 enthaltend einen Vektor nach Anspruch 11.
- 30 14. Verfahren zur Herstellung von Riboflavin, **dadurch gekennzeichnet, daß** ein Organismus gem. einem der Ansprüche 1 bis 5 eingesetzt wird.

- 5 15. Verfahren zur Herstellung eines Riboflavin produzierenden ein- oder mehrzelligen Organismus,
 dadurch gekennzeichnet, daß er so verändert wird, daß dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H-Bildung höher ist als derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.
- 10
16. Verfahren nach Anspruch 15,
 dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung des Organismus mittels gentechnischer Methoden erfolgt.
- 15 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16,
 dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung des Organismus durch Austausch des Promotors und/oder Erhöhung der Genkopienzahl erzielt wird.
- 20 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17,
 dadurch gekennzeichnet, daß durch die Änderung des endogenen Isocitrat-Dehydrogenase-Gens ein Enzym mit erhöhter Aktivität erzeugt wird.
- 25 19. Verwendung des Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 12 und 13 zur Herstellung von Riboflavin.
20. Verwendung des Isocitrat-Dehydrogenase-Gens nach einem der Ansprüche 6 bis 9 und der Gen-Struktur nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 12 und 13.
- 30
21. Verwendung des Vektors nach Anspruch 11 zur Herstellung eines Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 12 und 13.
- 35

1/10

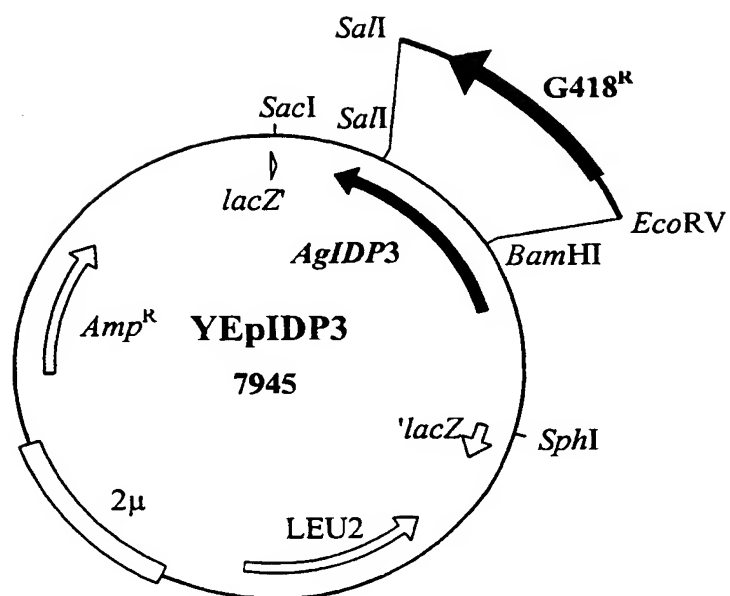


Fig. 1



2/10

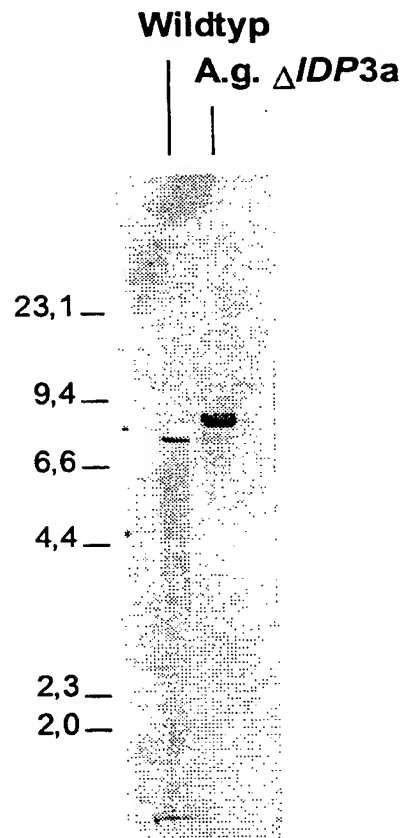


Fig. 2



3/10

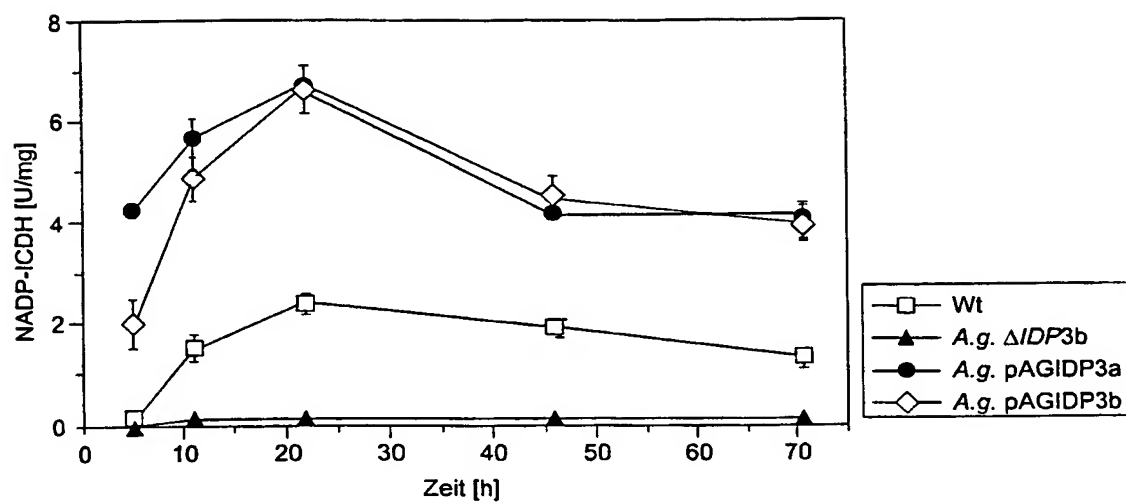


Fig. 3



4/10

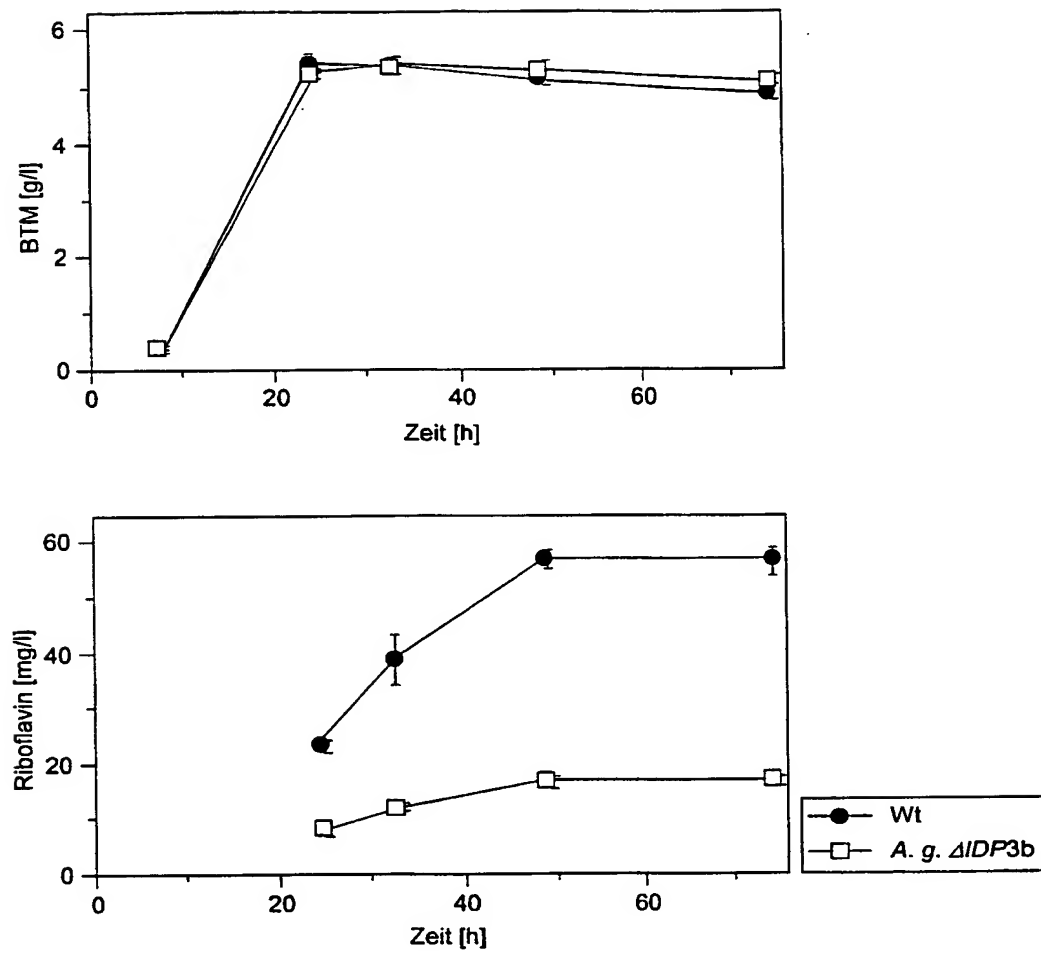


Fig. 4



5/10

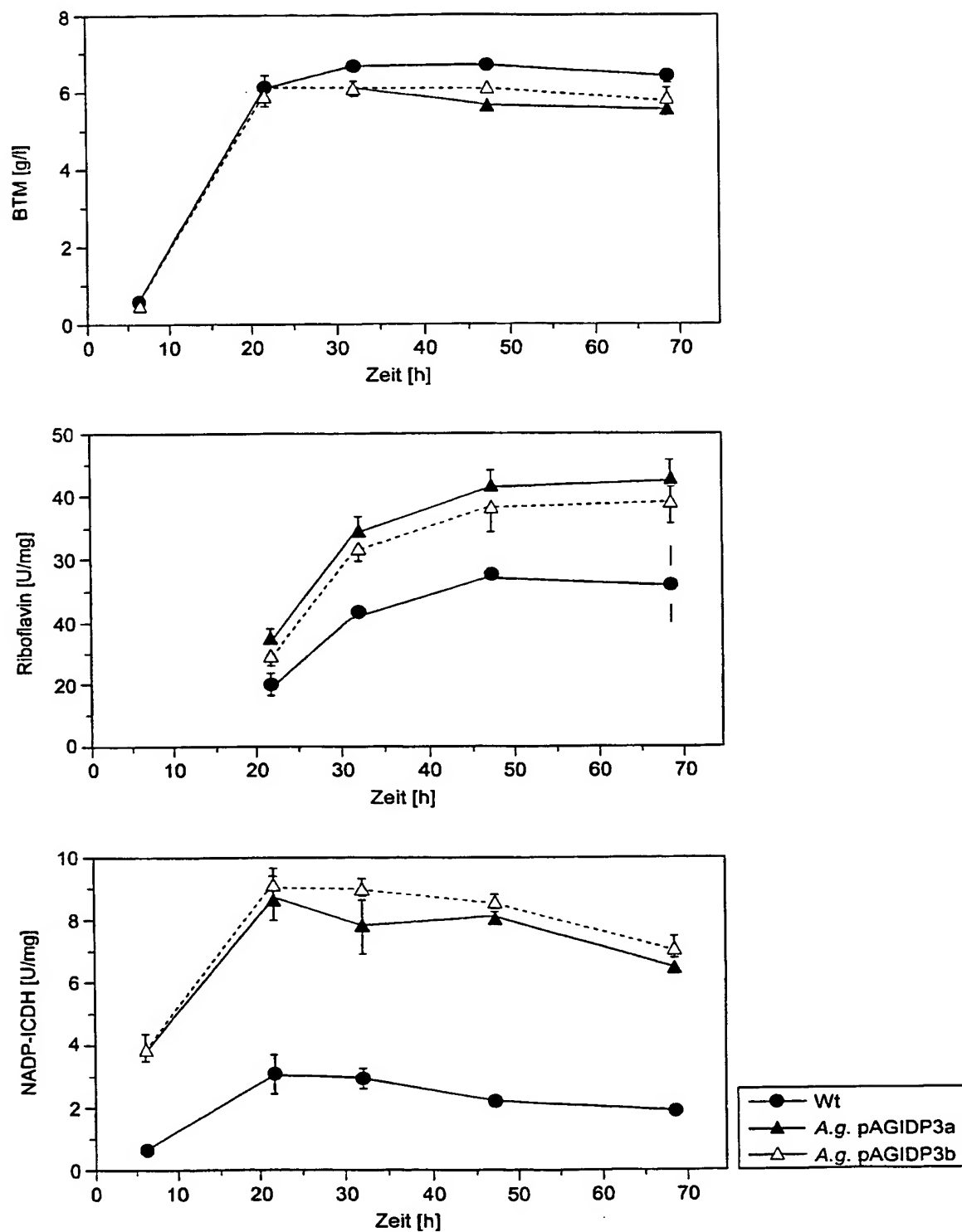


Fig. 5



6/10

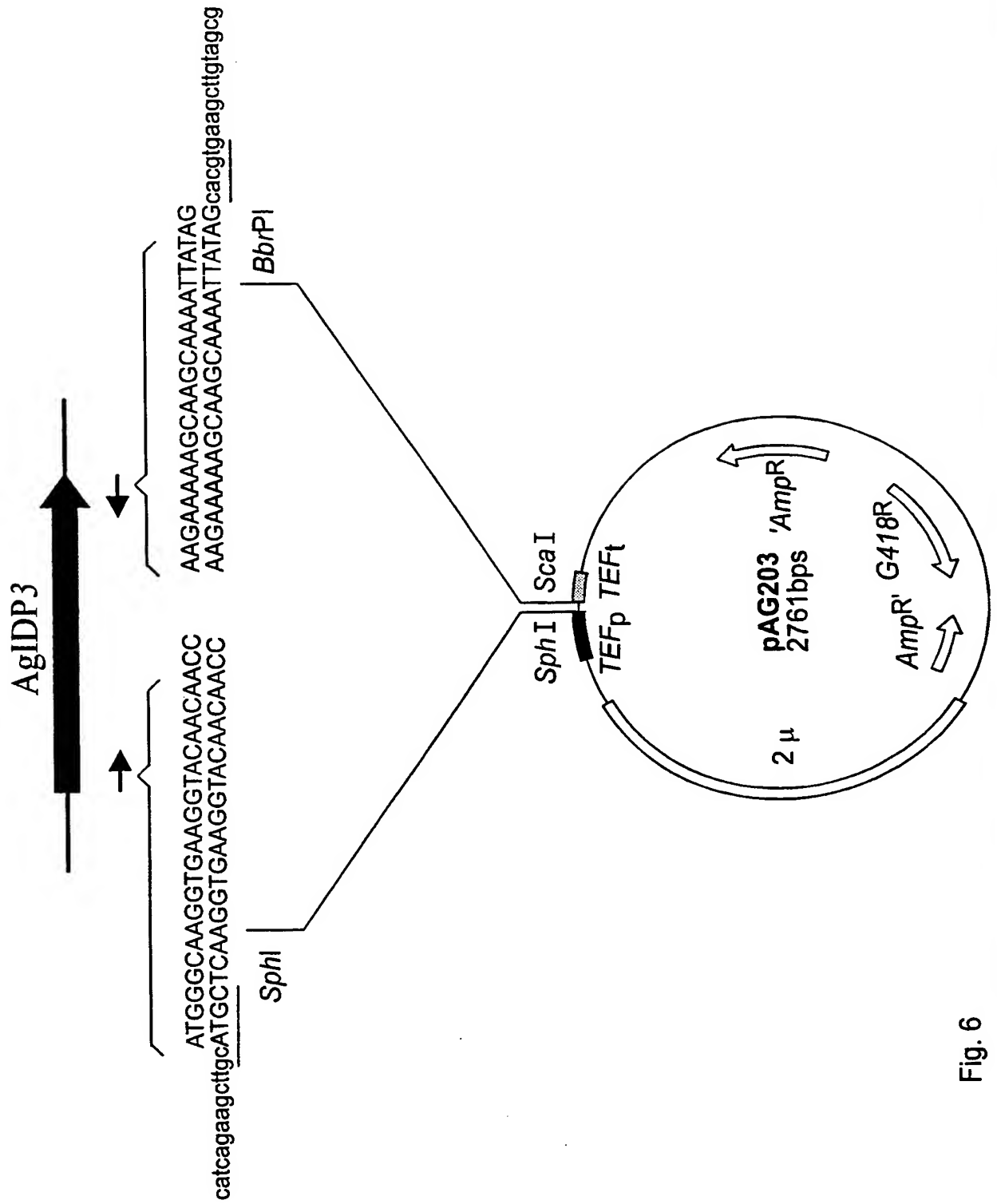


Fig. 6



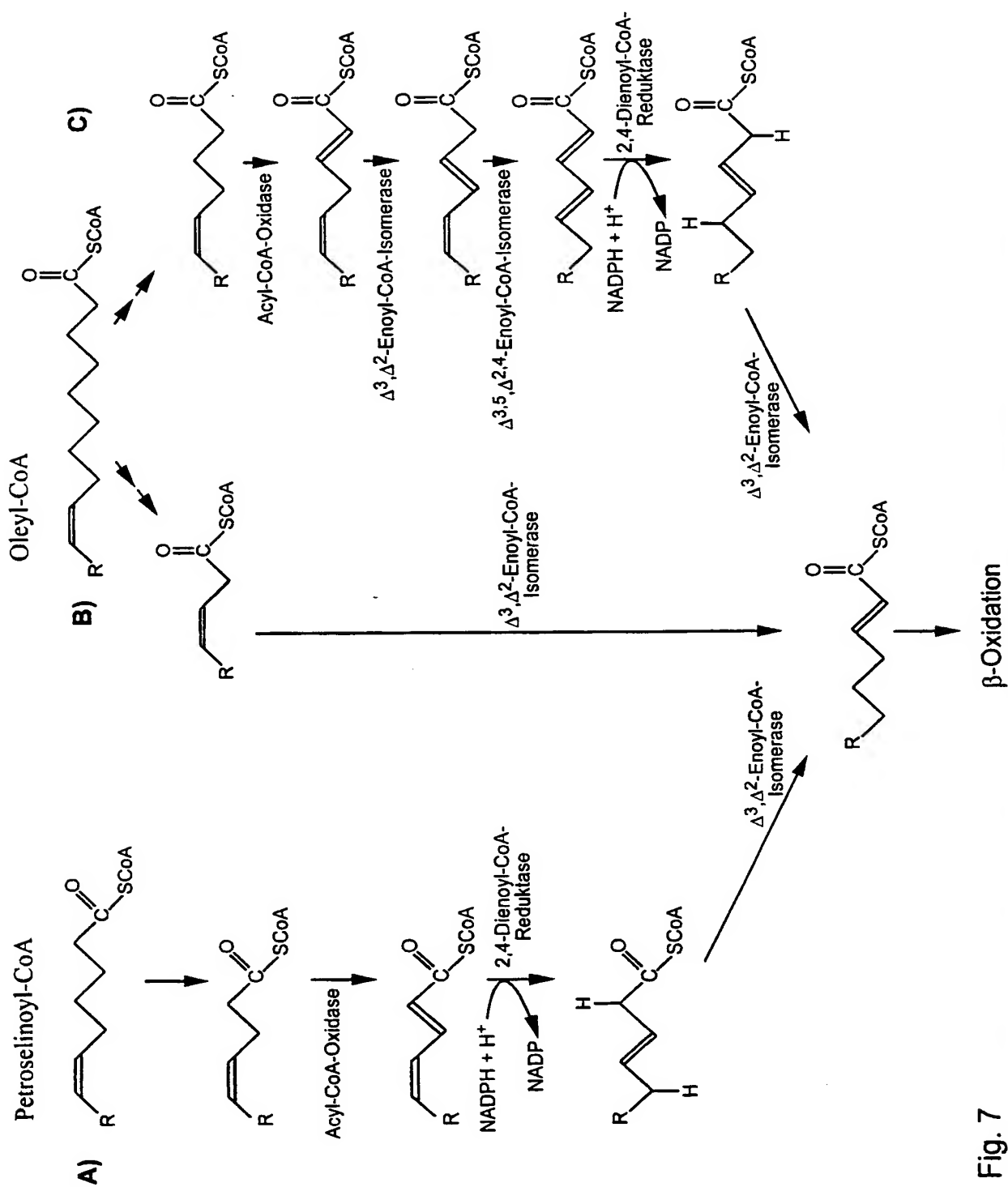


Fig. 7

8/10

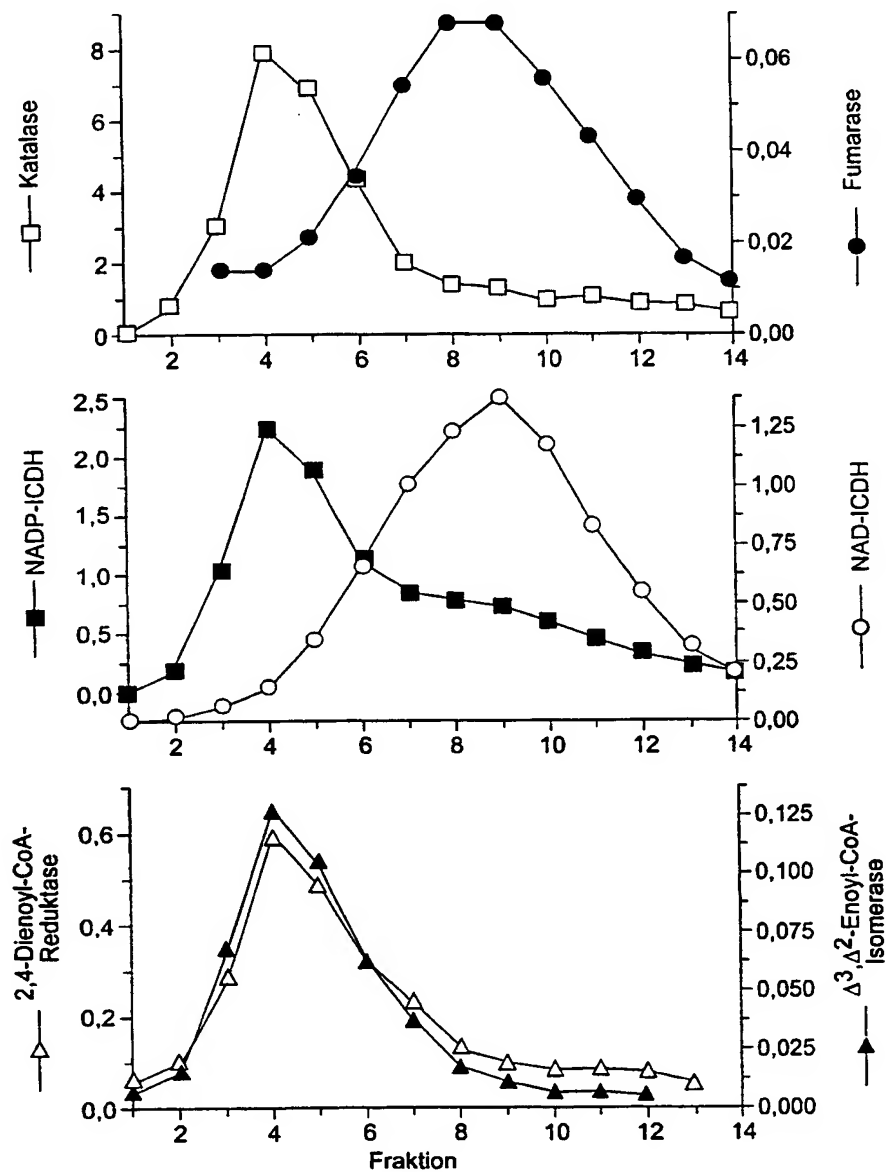


Fig. 8



9/10

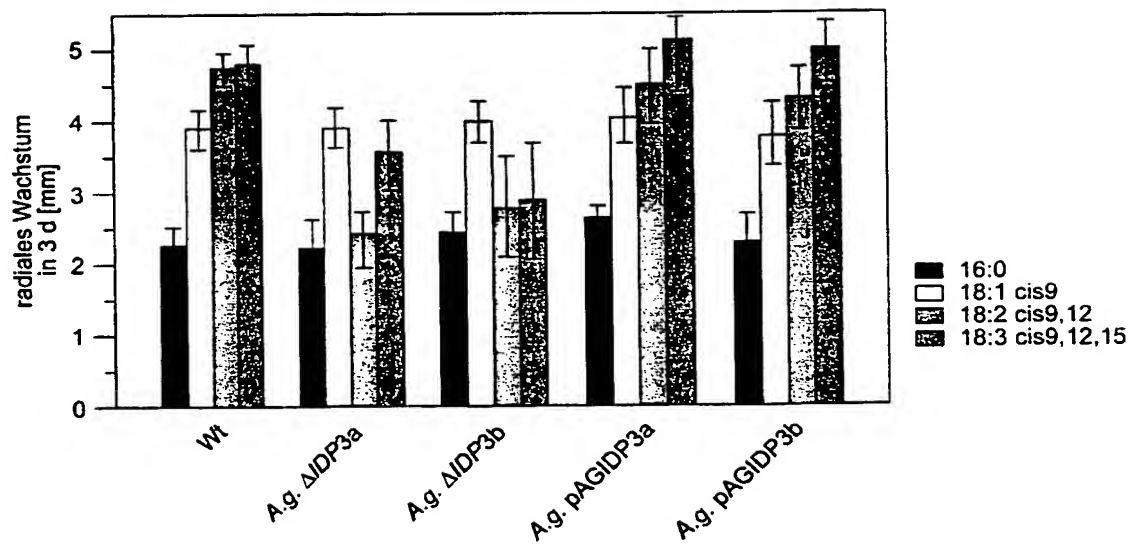
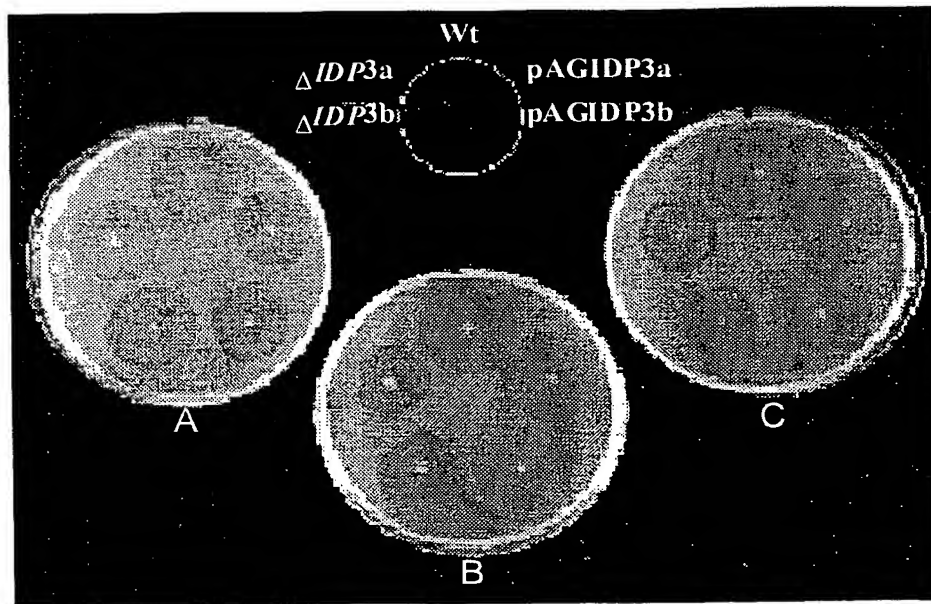


Fig. 9



10/10

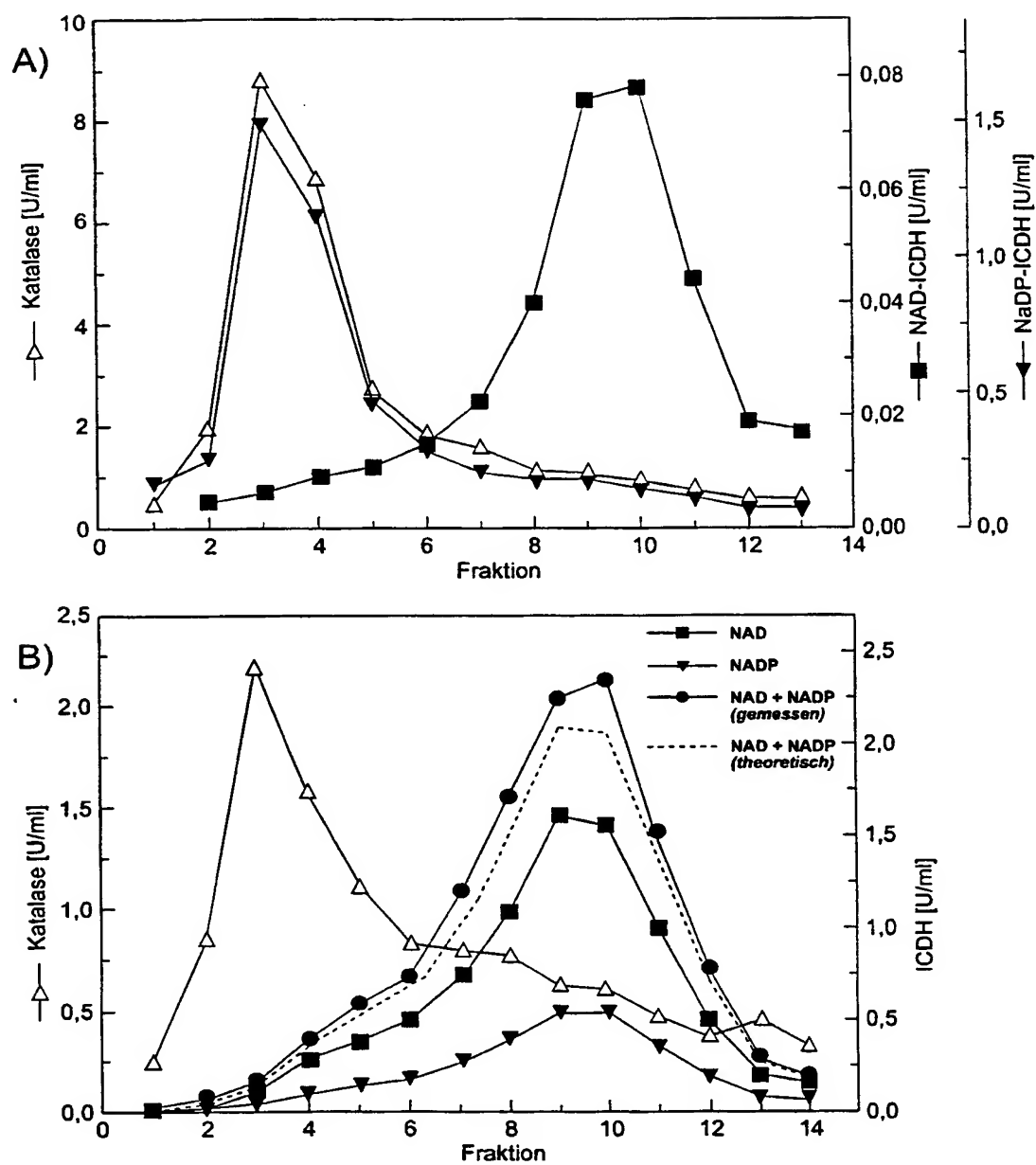


Fig. 10



SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF AG, Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> Ein- oder mehrzellige Organismen zur Herstellung von
Riboflavin

<130> FZJ9909PCT

<140> PCT/EP00/07370

<141> 2000-07-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2321

<212> DNA

<213> Pilz der Spezies Ashbya Gossypii

<220>

<221> CDS

<222> (718) .. (1266)

<400> 1

```
ctgcagcaaaa tcgaggtgat cgccaacgag gtggacgtgc ggcaggacgg gacctggtgc 60
atccggtacc gcgacgagtc cgagcacggg cagcacaagt cgcggtcgat cgcggtcgat 120
aagcagcgct ggcaacacct cgagcccgcg ccggtgtatt tctactgcgg cgatgggatac 180
agcgacctga gcgctgcgaa ggaatgcgac ctgctgtttg cgaagagtgg caaggacctg 240
atctccttct gcaagaagca ggacgttccg ttccgagagt tcaacacttt tgacgatgtg 300
ctgagcgcggt tcaagcggtt ggtggcgggc gaggcctctg tcacggaact ccaggggggc 360
tccgctgcgt aagcactgtc tgcacagtg accttgggcg tagctgcgat ttgtaactac 420
ctacgtaatt agtcctgctc gcgctgcggt ccagtgttag gcacgcccc catgaaaggc 480
agccgtaagc aattagtaac ggcctagtag ggctccgatg tatgtgctag cacatgacag 540
cccaacgggt tgagaagtcc ggctcgaatc atttccgcgc cgagtgggtc gtgggtggag 600
ccgcccgaac ccttgtcagc gggggcagtt ggatataagg cagtgggtgt agcaaaagtg 660
agXtgctgca tttcacgaag ccgagcgcaa caacgcacag acatcagtaa gcagct atg 720
Met
1
```

```
ggc aag gtg aag gta caa caa ccc atc gtc gag atg gac ggc gac gaa 768
Gly Lys Val Lys Val Gln Gln Pro Ile Val Glu Met Asp Gly Asp Glu
5 10 15
```

```
cag acg cgg atc atc tgg cac ttg atc aag gat cag ctc atc ttc ccc 816
Gln Thr Arg Ile Ile Trp His Leu Ile Lys Asp Gln Leu Ile Phe Pro
20 25 30
```



tac ttg gac gtg gac ttg aag tac tac gat ctt tcc att gag aac agg 864
 Tyr Leu Asp Val Asp Leu Lys Tyr Tyr Asp Leu Ser Ile Glu Asn Arg
 35 40 45

gat gcc acc gag gac cgc gtg act gtg gag tct gcg gag gcg acc ctc 912
 Asp Ala Thr Glu Asp Arg Val Thr Val Glu Ser Ala Glu Ala Thr Leu
 50 55 60 65

aag tac ggc gtt gcc gtc aag tgt gcg att att acc ccg gac gag gcg 960
 Lys Tyr Gly Val Ala Val Lys Cys Ala Ile Ile Thr Pro Asp Glu Ala
 70 75 80

cgt gtc gag gag ttc ggg ctc aag gag atg tgg aag tct ccc aac ggg 1008
 Arg Val Glu Glu Phe Gly Leu Lys Glu Met Trp Lys Ser Pro Asn Gly
 85 90 95

acc atc cgg aac atc ctc ggc ggg acc gtc ttc aga gag ccc att att 1056
 Thr Ile Arg Asn Ile Leu Gly Gly Thr Val Phe Arg Glu Pro Ile Ile
 100 105 110

atc cca agg atc ccc aga ctg gtg ccc ggc tgg aac gag ccg atc att 1104
 Ile Pro Arg Ile Pro Arg Leu Val Pro Gly Trp Asn Glu Pro Ile Ile
 115 120 125

gtc ggc aga cac gcg ttt ggg gac cag tac aag gcg acc gac gtt gtc 1152
 Val Gly Arg His Ala Phe Gly Asp Gln Tyr Lys Ala Thr Asp Val Val
 130 135 140 145

att cca ggc gag ggc acg ttg aag ctg gtc ttt gaa agc aag gac ggg 1200
 Ile Pro Gly Glu Gly Thr Leu Lys Leu Val Phe Glu Ser Lys Asp Gly
 150 155 160

gac aag tcc aag aat ctt gac ctg gag ttc ttt gaa tac ccc aag gat 1248
 Asp Lys Ser Lys Asn Leu Asp Leu Glu Phe Phe Glu Tyr Pro Lys Asp
 165 170 175

ggc ggt gtt gcc atg acc atgtactaca ccaccgaactc gatcaccggc 1296
 Gly Gly Val Ala Met Thr
 180

tttgccaaagt cgagcttcga gttggcggtg caaagaaaga tgccgctata ttcgacaacg 1356
 aagaacacga tcttgaagaa gtacgacggc aagtttaagg atattttcga gggcatgtac 1416
 ccagcggagt acaaggagaa gtttgaggct gctggcatct ggtatgaaca cagactgatt 1476
 gacgatatgg ttgcgcagat gttgaagtcc aagggcggct tcatcattgc catgaagaac 1536
 tacgatggtg atgtgcagtc ggacatcgtc gccagggtc tcgggtcttt ggggtctcatg 1596
 acttctgttc ttgtgtctcc agatggaaag accttcgaga gtgaggccgc acatggcact 1656
 gtcaccggc actacagaca gcaccagcag ggcaaggaaa catccaccaa ctctattgcc 1716
 tctatttttg cctggatgcg cggattata cacagaggta aggtcgacgg taccacagat 1776
 gtcgtgaagt tcggcgagtt gttggagaag tccacctgg acacggtgca ggaggacatc 1836
 atgaccaagg acctagcgtt gattttgggc aagaccgaca gagccagcta tgttaccacg 1896



3

gaagagttta tcacagcagt agcgaaccgc ttagcgatgg ctacaagcgt cttttttgtg 1956
 aataagaaaa agcaagcaaa attatagcct aggctgcctg tagcgtctat ttattactag 2016
 tctagcatat ctagcacaag aatatagata ctgagccatc cgcccaggat tacagtcagg 2076
 attccaactt gtaaacctcc ggtggtgcgc actcgccgca aattaggtga gcttgccatt 2136
 agtcatccga ggcgcagaat gagtaggggtt tatagtaaac ccgggtgctg taacaccaga 2196
 tcccactttt cctggcacag tatttttggc gacaacggca ctgctaaccg tttctcaact 2256
 acgcgcaata atgtaggtcg cacgggtccga tgaaaactaa tgcgcagtag catgacatgg 2316
 aattc 2321

<210> 2

<211> 183

<212> PRT

<213> Pilz der Spezies Ashbya Gossypii

<400> 2

Met Gly Lys Val Lys Val Gln Gln Pro Ile Val Glu Met Asp Gly Asp
 1 5 10 15
 Glu Gln Thr Arg Ile Ile Trp His Leu Ile Lys Asp Gln Leu Ile Phe
 20 25 30
 Pro Tyr Leu Asp Val Asp Leu Lys Tyr Tyr Asp Leu Ser Ile Glu Asn
 35 40 45
 Arg Asp Ala Thr Glu Asp Arg Val Thr Val Glu Ser Ala Glu Ala Thr
 50 55 60
 Leu Lys Tyr Gly Val Ala Val Lys Cys Ala Ile Ile Thr Pro Asp Glu
 65 70 75 80
 Ala Arg Val Glu Glu Phe Gly Leu Lys Glu Met Trp Lys Ser Pro Asn
 85 90 95
 Gly Thr Ile Arg Asn Ile Leu Gly Gly Thr Val Phe Arg Glu Pro Ile
 100 105 110
 Ile Ile Pro Arg Ile Pro Arg Leu Val Pro Gly Trp Asn Glu Pro Ile
 115 120 125
 Ile Val Gly Arg His Ala Phe Gly Asp Gln Tyr Lys Ala Thr Asp Val
 130 135 140
 Val Ile Pro Gly Glu Gly Thr Leu Lys Leu Val Phe Glu Ser Lys Asp
 145 150 155 160
 Gly Asp Lys Ser Lys Asn Leu Asp Leu Glu Phe Phe Glu Tyr Pro Lys
 165 170 175
 Asp Gly Gly Val Ala Met Thr
 180



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/11052 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53,
15/80, 9/04, 1/15, C12P 25/00 // (C12N 1/15, C12R 1:645)

20, D-52428 Jülich (DE). MAETING, Ines [DE/DE];
Wiesenstr. 3, D-52428 Jülich (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07370

(74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Lintorfer Strasse 10, D-40878
Ratingen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Juli 2000 (31.07.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 37 548.8 9. August 1999 (09.08.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
D-67056 Ludwigshafen (DE). FORSCHUNGSZEN-
TRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; D-52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): ALTHÖFER, Hen-
ning [DE/DE]; Mainstrasse 12, D-67117 Limburgerhof
(DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Rossmarktstrasse
27, D-67346 Speyer (DE). REVUELTA DOVAL, Jose
L. [ES/ES]; Grillo 11 4E, E-37001 Salamanca (ES).
SANTOS GARCIA, Maria Angeles [ES/ES]; C/Escue-
las, 1-5, E-37001 Salamanca (ES). SAHM, Hermann
[DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE).
STAHMANN, Klaus-Peter [DE/DE]; Wilhelmstrasse

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 5. Juli 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/11052 A3

(54) Title: MONOCELLULAR OR MULTICELLULAR ORGANISMS FOR THE PRODUCTION OF RIBOFLAVIN

(54) Bezeichnung: EIN- ODER MEHRZELLIGE ORGANISMEN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN

(57) Abstract: The invention relates to a monocellular or multicellular organism, especially a microorganism, for biotechnological production of riboflavin, whereby the enzymatic activity thereof with respect to NAD(P)H formation is higher than that of a wild type of species *Ashbya gossypii* ATCC10895.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft einen ein- oder mehrzelligen Organismus, insbesondere Mikroorganis-
mus, zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin, wobei dessen Enzymaktivität bezüglich der NAD(P)H Bildung höher ist als
derjenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/07370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N15/80 C12N9/04 C12N1/15 C12P25/00
/(C12N1/15, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | HENKE BIRGIT ET AL: "IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 6, 6 February 1998 (1998-02-06), pages 3702-3711, XP002157778 ISSN: 0021-9258 page 3705; figure 3 page 3709, column 2 -page 3710 --- -/-- | 7-10 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2001

Date of mailing of the international search report

01/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Blanco Urgoiti, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

/EP 00/07370

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | WO 97 03208 A (BASF AG ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE); KAESLER BRUNO (DE); SA) 30 January 1997 (1997-01-30) cited in the application the whole document --- | |
| A | EP 0 927 761 A (BASF AG) 7 July 1999 (1999-07-07) the whole document --- | |
| A | EP 0 405 370 A (HOFFMANN LA ROCHE) 2 January 1991 (1991-01-02) the whole document ----- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

on patent family members

International Application No

EP 00/07370

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9703208 | A | 30-01-1997 | DE 19525281 C | 04-04-1996 |
| | | | DE 19545468 A | 21-08-1997 |
| | | | CA 2223877 A | 30-01-1997 |
| | | | CN 1193356 A | 16-09-1998 |
| | | | EP 0839211 A | 06-05-1998 |
| | | | JP 11509409 T | 24-08-1999 |
| | | | US 5976844 A | 02-11-1999 |
| EP 0927761 | A | 07-07-1999 | CN 1227870 A | 08-09-1999 |
| | | | WO 9933993 A | 08-07-1999 |
| | | | EP 1040193 A | 04-10-2000 |
| | | | JP 11243975 A | 14-09-1999 |
| EP 0405370 | A | 02-01-1991 | AT 195971 T | 15-09-2000 |
| | | | CN 1049185 A | 13-02-1991 |
| | | | DE 69033616 D | 05-10-2000 |
| | | | EP 1001026 A | 17-05-2000 |
| | | | JP 3117489 A | 20-05-1991 |
| | | | JP 10066562 A | 10-03-1998 |
| | | | US 5925538 A | 20-07-1999 |
| | | | US 5837528 A | 17-11-1998 |



4
2

4
2
6

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7

C12N15/53

C12N15/80

C12N9/04

C12N1/15

C12P25/00

/(C12N1/15,C12R1:645)

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | HENKE BIRGIT ET AL: "IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 273, Nr. 6, 6. Februar 1998 (1998-02-06), Seiten 3702-3711, XP002157778 ISSN: 0021-9258 Seite 3705; Abbildung 3 Seite 3709, Spalte 2 -Seite 3710 --- -/-- | 7-10 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/02/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Blanco Urgoiti, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | WO 97 03208 A (BASF AG ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE); KAESLER BRUNO (DE); SA) 30. Januar 1997 (1997-01-30) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- | |
| A | EP 0 927 761 A (BASF AG) 7. Juli 1999 (1999-07-07) das ganze Dokument ----- | |
| A | EP 0 405 370 A (HOFFMANN LA ROCHE) 2. Januar 1991 (1991-01-02) das ganze Dokument ----- | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung... die selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07370

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9703208 A | 30-01-1997 | DE 19525281 C | 04-04-1996 |
| | | DE 19545468 A | 21-08-1997 |
| | | CA 2223877 A | 30-01-1997 |
| | | CN 1193356 A | 16-09-1998 |
| | | EP 0839211 A | 06-05-1998 |
| | | JP 11509409 T | 24-08-1999 |
| | | US 5976844 A | 02-11-1999 |
| EP 0927761 A | 07-07-1999 | CN 1227870 A | 08-09-1999 |
| | | WO 9933993 A | 08-07-1999 |
| | | EP 1040193 A | 04-10-2000 |
| | | JP 11243975 A | 14-09-1999 |
| EP 0405370 A | 02-01-1991 | AT 195971 T | 15-09-2000 |
| | | CN 1049185 A | 13-02-1991 |
| | | DE 69033616 D | 05-10-2000 |
| | | EP 1001026 A | 17-05-2000 |
| | | JP 3117489 A | 20-05-1991 |
| | | JP 10066562 A | 10-03-1998 |
| | | US 5925538 A | 20-07-1999 |
| | | US 5837528 A | 17-11-1998 |



1

1

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 30 NOV 2001

WIPO PCT

| | | |
|--|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts FZJ 9909 PCT | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07370 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 31/07/2000 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 09/08/1999 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/53 | | |
| Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al. | | |



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|--|
| Datum der Einreichung des Antrags 01/03/2001 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 28.11.2001 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter A. M. Merlos Tel. Nr. +49 89 2399 8559  |

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-8 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-20 eingegangen am 13/09/2001 mit Schreiben vom 10/09/2001

Zeichnungen, Blätter:

1-11 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | | |
|--------------------------------|-----------------|--|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche | 3-5, 7, 8; 9-14 teilweise; 15-17; 18-20 teilweise |
| | Nein: Ansprüche | 1, 2, 6; 9-14, teilweise; 18-20 teilweise |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche | 3-5 teilweise, 7, 8; 9-14, teilweise; 18-20 teilweise |
| | Nein: Ansprüche | 1, 2; 3-5 teilweise; 6; 9-14 teilweise; 15-17; 18-20 teilweise |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche | 1-20 |
| | Nein: Ansprüche | |

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



1. Art. 34 (2,b) PCT

Die geänderten Ansprüche 1-20 scheinen den Anforderungen des Art. 34(2,b) PCT zu entsprechen. Es sei in diesem Zusammenhang aber darauf hingewiesen, dass offensichtlich die ursprünglichen Anmeldungsunterlagen, auf die zur Stützung der eingeführten Änderungen Bezug genommen wurde, nicht mit den der Behörde vorliegenden Anmeldungsunterlagen übereinstimmen. Die Anmeldung wie ursprünglich eingereicht, enthält eine Beschreibung von acht Seiten. Mit Hinblick auf die geänderten Ansprüche 6, 7 und 8 wurde aber beispielsweise auf eine Seite 11, Zeilen 29-34 Bezug genommen. Ebenso befindet sich auf Seite 7, Zeilen 19-30 keine sinngemässe Offenbarung für den geänderten Anspruch 9.

2. Art. 33(2), (3) PCT

Ein Teil der geänderten Ansprüche 1-20 scheint nach wie vor nicht den Anforderungen des Art. 33(2), (3) PCT zu entsprechen. Dokument "Henke et al., J. of Biol Chem., Bd. 273, Nr. 6, 1998, 3702-3711", beschreibt die Identifizierung einer peroxisomalen Isocitrat-Dehydrogenase (Idp3) und des sie kodierenden Gens aus *S. cerevisiae*, sowie dessen rekombinante Expression in entsprechend transformierten *E. coli* Zellen (s. Fig. 3, S. 3706, linke Spalte, zweiter Absatz und rechte Spalte, einschl. zweiter Absatz, Seite 3709, rechte Spalte erster Absatz). Die transformierten *E. coli* Zellen zeigten einen massiven Anstieg der Isocitratdehydrogenase-Aktivität. Anspruch 1 bezieht sich auf einen Mikroorganismus zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er eine Aktivität eines NAD(P)H bildenden Enzyms aufweist, die höher ist als diejenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC 10895 (s. auch unter Punkt 3.). Der beabsichtigte Verwendungszweck, also die biotechnische Herstellung von Riboflavin, ist als optionales und daher nicht limitierendes Merkmal anzusehen, solange nicht den Mikroorganismus entsprechend kennzeichnende spezifische (d.h. neuheitsgebende) und speziell für diesen Zweck benötigte Merkmale aufgeführt sind. Daher wäre *E. coli*, welches rib Gene enthält (s. beispielsweise E0 0 405 370, Seite 3, Zeilen 25-30) gleichermassen für die Biosynthese von Riboflavin geeignet, auch wenn dies von Henke et al. nicht nachgewiesen wurde, da hier lediglich die Verifizierung der klonierten Idp3 im Vordergrund stand. Zudem sei darauf hingewiesen, dass sich Anspruch 1 auf einen Mikroorganismus bezieht, der eine erhöhte Aktivität



bezüglich eines NAD(P)H bildenden Enzyms aufweist. Zur Höhe des tatsächlich in der Zelle gebildeten NAD(P)H-Gehalts wird auch hier nicht Bezug genommen. Anspruch 1 wird daher nicht als neu und erfinderisch im Sinne von Art. 33(2), (3) PCT angesehen. Dies gilt ebenso für den abhängigen Anspruch 2 und die Ansprüche 11, 12, 19 und 20, soweit sie sich direkt oder indirekt auf Anspruch 6 rückbeziehen (s. unten).

Anspruch 6 wird nicht als neu und erfinderisch angesehen, da das aus Henke et al. bekannte ldp3-Gen zu 65% identisch ist mit der in der gegenwärtigen Anmeldung beschriebenen DNA-Sequenz des ldp3-Gens und somit unter den Begriff "Allelvariation" fällt (s. Definition des Begriffes Allelvariation auf Seite 6, Zeilen 3-6). Dies gilt ebenfalls für die Ansprüche 9 und 10.

Die Ansprüche 3-5 scheinen sich auf einen neuen und soweit sie sich auf Anspruch 2 rückbeziehen auch auf einen erfinderischen Gegenstand zu beziehen. Dies gilt auch für die direkt abhängigen Ansprüche 14, 18. Ansprüche 7, 8 sowie davon direkt oder indirekt abhängige Ansprüche 9-14 und 18 können ebenfalls als neu und erfinderisch angesehen werden.

3. Art. 5/6 PCT

Der gegenwärtigen Erfindung liegt die Entdeckung zugrunde, dass mit einer verstärkten Isocitrat-dehydrogenase-Expression im Pilz Ashbya ATCC 10895 auch ein deutlicher Anstieg der Riboflavinbildung einhergeht. Allerdings lässt sich aus dieser Beobachtung kein allgemein gültiges Prinzip ableiten, wonach der Anstieg irgendeines anderen NAD(P)H bildenden Enzyms zum gleichen Ergebnis führt. Mit Hinblick auf die auf ldp3 limitierte Beschreibung, sind die Ansprüche, die lediglich vage auf ein NAD(P)H bildendes Enzym gerichtet sind, zu breit und daher nicht mit den Erfordernissen des Art. 5 vereinbar.

Desweiteren sei darauf hingewiesen, dass ohne spezifischen Vergleichswert oder klare Definition des Vergleichswerts (bspw. ldp3-Gehalt unter spezifischen Wachstumbedingungen) oder Angabe eines präzisen, strukturellen Merkmals (bspw. verstärkte Expression oder erhöhte Kopienzahl des ldp3-Gens, die beide eine erhöhte Aktivität zur Folge haben, s. auch Anspruch 11), Anspruch 1 (auch Ansprüche 2-3) unklar ist (Art. 6 PCT), da aus der derzeitigen Formulierung nicht eindeutig hervorgeht, aufgrund welcher Umstände die Aktivität erhöht ist. So könnten auch lediglich geänderte Kulturbedingungen eine erhöhte ldp3-Aktivität bewirken. Zudem scheint ein Vergleich nur zwischen zwei Mikroorganismen der



gleichen Species sinnvoll, d.h. Idp3-Gehalt im Wildtypstamm *A. gossypii* ATCC10895 unter entsprechend spezifizierten Wachstumsbedingungen und Idp3-Gehalt eines "genetisch veränderten" Stamms von *A. gossypii* ATCC10895 unter den gleichen Wachstumsbedingungen.

4. Schliesslich sei der Anmelder darauf hingewiesen, dass sich das PCT und Euro-Verfahren unter anderem darin unterscheiden, dass in der PCT-Phase als letzte Aktion lediglich ein vorläufiger Prüfungsbericht erstellt wird, aber keine bindende Entscheidung getroffen wird, sodass ein Recht auf rechtliches Gehör nicht verletzt werden kann.

Neue Ansprüche 1-20:

1. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin, **dadurch gekennzeichnet, daß** er eine Aktivität eines NAD(P)H-bildenden Enzyms aufweist, die höher ist als diejenige eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895.
2. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** er eine erhöhte Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität aufweist.
3. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Pilz ist.
4. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Pilz aus der Gattung *Ashbya* ist.
5. Ein- oder mehrzelliger Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, daß** er ein Pilz der Spezies *Ashbya gossypii* ist.
6. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen mit einer für die in Fig. 11 (SEQ ID No. 2) angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
7. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach Anspruch 6 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1 bis 1262 gem. der Fig. 11 (SEQ ID No. 1).
8. Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 oder 7 mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz mit Nukleotid -661 bis -1 gem. der Fig. 11 (SEQ ID No. 1).
9. Gen-Struktur enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8 sowie mit diesem operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen.
10. Vektor enthaltend ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8 oder eine Gen-Struktur nach Anspruch 9.

11. Genetisch veränderter Mikroorganismus zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin enthaltend in replizierbarer Form ein Isocitrat-Dehydrogenase-Gen nach einem der Ansprüche 6 bis 8, welches im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus verstärkt exprimiert wird und/oder deren Kopienzahl erhöht ist.
12. Genetisch veränderter Mikroorganismus gemäß Anspruch 11 enthaltend eine Gen-Struktur nach Anspruch 9 oder einen Vektor nach Anspruch 10.
13. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 11 oder 12 enthaltend eine Isocitrat-Dehydrogenase, die im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus eine gesteigerte katalytische Aktivität und/oder eine verringerte Hemmbarkeit gegenüber Inhibitoren aufweist.
14. Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Riboflavin, **dadurch gekennzeichnet, daß** ein Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 11 bis 13 eingesetzt wird.
15. Verfahren zur Herstellung eines Riboflavin produzierenden ein- oder mehrzelligen Mikroorganismus, **dadurch gekennzeichnet, daß** durch gentechnische Methoden die Aktivität eines NAD(P)H-bildenden Enzyms im Vergleich zu derjenigen eines Wildtyps der Species *Ashbya gossypii* ATCC10895 erhöht wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Erhöhung der Enzymaktivität durch Austausch des Promotors und/oder Erhöhung der Genkopienzahl erzielt wird.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Erhöhung der Enzymaktivität durch eine gesteigerte katalytische Aktivität und/oder eine verringerte Hemmbarkeit gegenüber Inhibitoren der Isocitrat-Dehydrogenase erzeugt wird.
18. Verwendung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 11 bis 13 zur Herstellung von Riboflavin.



19. Verwendung eines Isocitrat-Dehydrogenase-Gens nach einem der Ansprüche 6 bis 8 zur Herstellung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 11 bis 13.
20. Verwendung einer Gen-Struktur nach Anspruch 9 oder eines Vektors nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5 sowie 11 bis 13.



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|--|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts FZJ 9909 PCT | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/07370 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 31/07/2000 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09/08/1999 |
| Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al. | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGS-GEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N15/80 C12N9/04 C12N1/15 C12P25/00
 //(C12N1/15, C12R1:645)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | <p>HENKE BIRGIT ET AL: "IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 273, Nr. 6, 6. Februar 1998 (1998-02-06), Seiten 3702-3711, XP002157778</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>Seite 3705; Abbildung 3</p> <p>Seite 3709, Spalte 2 -Seite 3710</p> <p>---</p> <p>-/--</p> | 7-10 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Blanco Urgoiti, B



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGEBENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | WO 97 03208 A (BASF AG ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE); KAESLER BRUNO (DE); SA) 30. Januar 1997 (1997-01-30) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---- | |
| A | EP 0 927 761 A (BASF AG) 7. Juli 1999 (1999-07-07) das ganze Dokument ---- | |
| A | EP 0 405 370 A (HOFFMANN LA ROCHE) 2. Januar 1991 (1991-01-02) das ganze Dokument ----- | |



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07370

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9703208 | A | 30-01-1997 | DE 19525281 C | 04-04-1996 |
| | | | DE 19545468 A | 21-08-1997 |
| | | | CA 2223877 A | 30-01-1997 |
| | | | CN 1193356 A | 16-09-1998 |
| | | | EP 0839211 A | 06-05-1998 |
| | | | JP 11509409 T | 24-08-1999 |
| | | | US 5976844 A | 02-11-1999 |
| ----- | | | | |
| EP 0927761 | A | 07-07-1999 | CN 1227870 A | 08-09-1999 |
| | | | WO 9933993 A | 08-07-1999 |
| | | | EP 1040193 A | 04-10-2000 |
| | | | JP 11243975 A | 14-09-1999 |
| ----- | | | | |
| EP 0405370 | A | 02-01-1991 | AT 195971 T | 15-09-2000 |
| | | | CN 1049185 A | 13-02-1991 |
| | | | DE 69033616 D | 05-10-2000 |
| | | | EP 1001026 A | 17-05-2000 |
| | | | JP 3117489 A | 20-05-1991 |
| | | | JP 10066562 A | 10-03-1998 |
| | | | US 5925538 A | 20-07-1999 |
| | | | US 5837528 A | 17-11-1998 |
| ----- | | | | |



IDP3 Encodes a Peroxisomal NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase Required for the β -Oxidation of Unsaturated Fatty Acids*

(Received for publication, September 5, 1997)

Birgit Henke, Wolfgang Girzalsky, Veronique Berteaux-Lecellier‡, and Ralf Erdmann§

From the Department of Physiological Chemistry, Ruhr-Universität Bochum, 44780 Bochum, Germany

In *Saccharomyces cerevisiae* the metabolic degradation of saturated fatty acids is exclusively confined to peroxisomes. In addition to a functional β -oxidation system, the degradation of unsaturated fatty acids requires auxiliary enzymes, including a Δ^2,Δ^3 -enoyl-CoA isomerase and an NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase. We found both enzymes to be present in yeast peroxisomes. The impermeability of the peroxisomal membrane for pyrimidine nucleotides led to the question of how the NADPH needed by the reductase is regenerated in the peroxisomal lumen. We report the identification and functional analysis of the IDP3 gene product, which is a yeast peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. The newly identified peroxisomal protein is homologous to the mitochondrial Idp1p and cytosolic Idp2p, which both are yeast NADP-dependent isocitrate dehydrogenases. Yeast cells lacking Idp3p grow normally on saturated fatty acids, but growth is impaired on unsaturated fatty acids, indicating that the peroxisomal Idp3p is involved in their metabolic utilization. The data presented are consistent with the assumption that peroxisomes of *S. cerevisiae* contain the enzyme equipment needed for the degradation of unsaturated fatty acids, including an NADP-dependent isocitrate dehydrogenase, a putative constituent of a peroxisomal NADPH-regenerating redox system.

Peroxisomes harbor variable metabolic pathways that differ depending on cell type, developmental stage, and food supply (1, 2). In reference to the multiplicity of cellular functions and to the ability of cells to adjust the enzymatic equipment as well as the size and number of these organelles in response to the cellular demand, peroxisomes are appropriately called multipurpose organelles (3). The importance of peroxisomes for cellular function is especially emphasized by a number of inherited diseases in humans that are caused by peroxisomal dysfunction and usually have profound clinical consequences (4).

A typical metabolic pathway of peroxisomes is the β -oxidation of fatty acids (5, 6). In fact, whereas the presence of a mitochondrial β -oxidation system is restricted to mammalian

cells and a few protists (7), the fatty acid oxidation in peroxisomes is nearly ubiquitous among eukaryotic cells (7, 8). The peroxisomal and the mitochondrial degradation of fatty acids is performed by functionally comparable but genetically distinct proteins (8, 9). In fungi and plants, the degradation of fatty acids exclusively takes place in peroxisomes, and growth on fatty acids results in proliferation of peroxisomes accompanied by a massive induction of peroxisomal proteins including the β -oxidation enzymes (7, 10).

In addition to the chain shortening β -oxidation system, the oxidation of unsaturated fatty acids requires auxiliary enzymes for the elimination of the double bonds (8). Degradation of unsaturated fatty acids with odd-numbered double bonds requires a Δ^2,Δ^3 -enoyl-CoA isomerase (Fig. 1B) (11). For the degradation of unsaturated fatty acid with even-numbered double bonds, an NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase is needed in addition to the isomerase (Fig. 1A) (12). Recently, a novel pathway for the degradation of unsaturated fatty acids with double bonds at odd-numbered carbon atoms has been described that also requires the NADPH-dependent reductase described above (Fig. 1C) (13, 14). The successive reduction and isomerization of double bonds by these auxiliary enzymes results in the formation of intermediates that can reenter the β -oxidation spiral (8). The presence of both the Δ^2,Δ^3 -enoyl-CoA isomerase and the NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase has been demonstrated in all peroxisomes studied so far (8). As the peroxisomal membrane has been suggested to be impermeable for small solutes (15), the requirement of the peroxisomal enoyl-CoA reductase for NADPH raises the question of the existence of an NADPH regenerating system in peroxisomes.

We applied a reverse genetic approach to identify proteins essential for peroxisome function in *Saccharomyces cerevisiae*. Here we report the identification, characterization, and functional analysis of a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Deficiency in this enzyme resulted in an impaired growth of *S. cerevisiae* on unsaturated fatty acids, whereas growth on saturated fatty acids was not affected. The peroxisomal Idp3p is suggested to be involved in the regeneration of the NADPH needed for the peroxisomal degradation of unsaturated fatty acids.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains, Growth Conditions, and General Methods—The yeast strains used in this study were *S. cerevisiae* wild-type UTL-7A (MATa, ura3-52, trp1, leu2-3,112, pex7 Δ (MATa, pex7::LEU2, ura3-52, trp1) (16), idp3 Δ (MATa, ura3-52, trp, leu2-3,112, idp3::kanMX4) (this paper), idp1 Δ (MATa, leu2-3,112, his3-1, trp1-289, idp1::URA3) (17), idp1, idp3 Δ (MATa, leu2-3,112, his3-1, trp1-289, idp1::URA3, idp3::kanMX4) (this paper), idp1/idp2 Δ (MATa, leu2-3,112, his3-1, trp1-289, idp1::URA3, idp2::URA3) (18), and idp1/idp2/idp3 Δ (MATa, leu2-3,112, his3-1, trp1-289, idp1::URA3, idp2::URA3, idp3::kanMX4) (this paper).

Yeast strains were grown at 30 °C in YPD or in minimal medium

* This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant Er 178/2-1. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Present address: Institut de Genetique et Microbiologie, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France.

§ To whom correspondence should be addressed: Ruhr-Universität Bochum, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsstr. 150, 44780 Bochum, Germany. Tel.: 0234-700-4947; Fax: 0234-709-4279; E-mail: Ralf.Erdmann@rz.ruhr-uni-bochum.de.

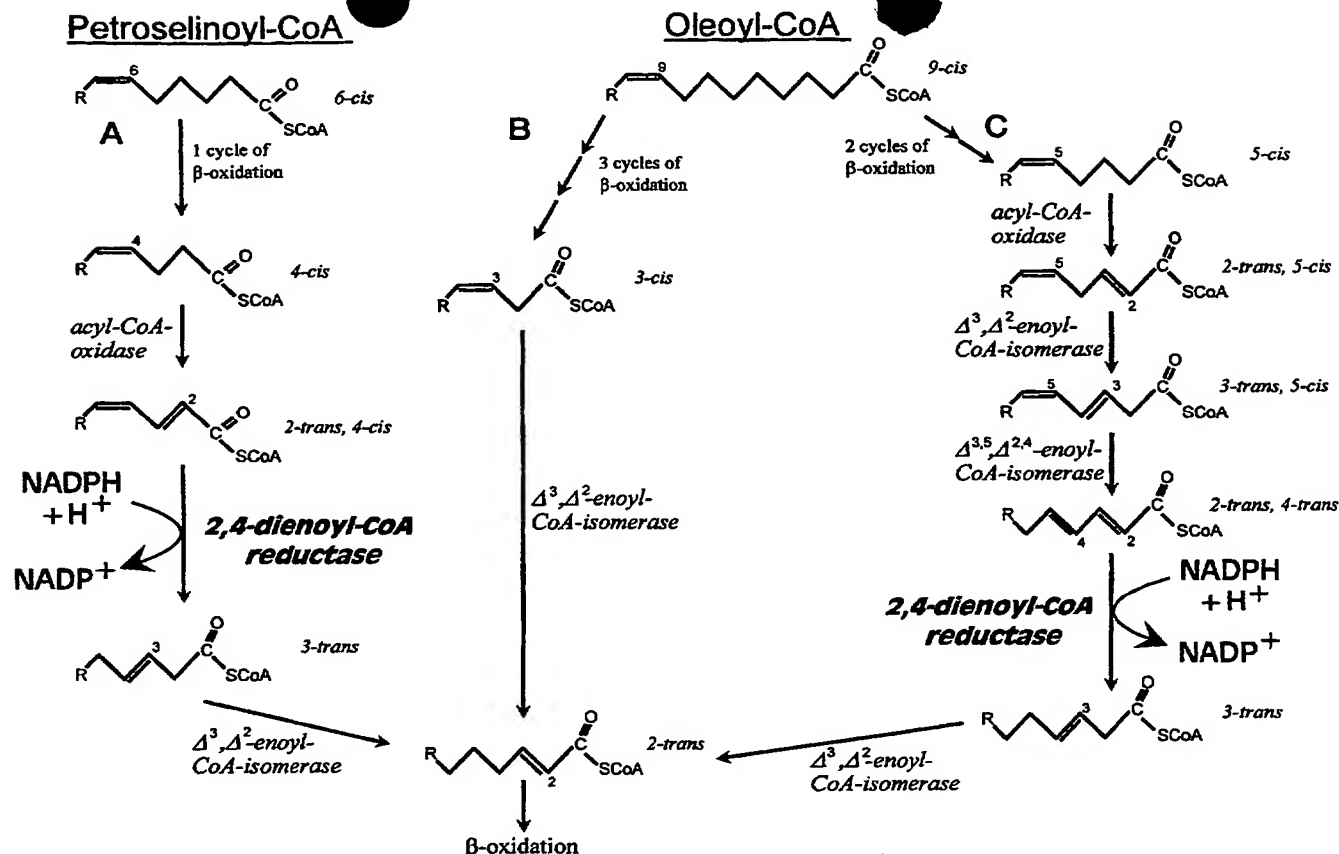


FIG. 1. Pathways of the peroxisomal degradation of unsaturated fatty acids. In addition to the β -oxidation spiral, auxiliary enzymes are required to degrade unsaturated fatty acids. A, fatty acids with double bonds at even-numbered carbon atoms require an NADP-dependent 2,4-dienoyl reductase and Δ^2, Δ^3 -enoyl-CoA isomerase (8). B, degradation of fatty acids with double bonds extending from odd-numbered carbon atoms at least requires the activity of the Δ^2, Δ^3 -enoyl-CoA isomerase (11). C, in the alternative pathway discovered by Smeland *et al.* (13), the NADP-dependent 2,4-dienoyl reductase is also needed for the degradation of fatty acids with odd-numbered double bonds.

(SD) as described previously (19). For oleic acid induction of peroxisome proliferation, cells were grown in SD medium to late log phase and then shifted into YNO (20) and incubated for 14 h. Necessary auxotrophic requirements were added according to Ausubel *et al.* (21).

Whole yeast cell extracts were prepared by the method of Yaffe and Schatz (22). Enzymatic modification of DNA, fragment purification, and bacterial transformation were performed essentially as described by Ausubel *et al.* (21). Yeast transformations were carried out according to Gietz and Sugino (23).

Purification and Amino Acid Sequencing of Idp3p.—High salt-extracted peroxisomal membranes were prepared from oleic acid-induced SKQ2N cells. Further separation of the peroxisomal membrane proteins was achieved by reverse-phase HPLC¹ according to Erdmann and Blobel (24).

For sequencing of Idp3p, the SDS samples of HPLC fractions containing the protein (fractions 42–46; see Fig. 2) were pooled and separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel. Polypeptides were electrophoretically transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane and visualized with 0.1% Amido Black in 10% acetic acid. Idp3p was excised, and Lys-C-derived peptides of the protein were separated by HPLC and subjected to sequence analysis on a gas phase sequencer according to Fernandez *et al.* (25). Protein sequence analysis was provided by the Rockefeller University Protein Sequencing Facility, which is supported in part by National Institutes of Health shared instrumentation grants and by funds provided by the U.S. Army and Navy for the purchase of equipment.

Isolation and Sequencing of IDP3.—According to the obtained internal sequences of Idp3p, degenerated sense (5'-GCCGAATTCA(C/T)C-CIAT(A/C/T)GT(A/G/C/T)GA(A/G)ATG-3') and antisense (5'-TCTAAG-

CTT(A/G/C/T)GCIAC(C/T)TC(A/G)TC(T/G/A)AT-3') oligonucleotide primers, distinguishing between the IDP3 gene and the highly homologous IDP1 and IDP2 genes were designed. The corresponding genomic region of the IDP3 gene was amplified by the polymerase chain reaction with yeast genomic DNA (100 ng; Promega, Madison, WI) as template. The amplification product was isolated and subcloned into a derivative pBluescript SK(+) using the Srf1 kit (Stratagene, La Jolla, CA), resulting in pSRF-IDP3. The authenticity of the insert was confirmed by DNA sequencing. A [³²P]dATP-labeled probe of 520 base pairs was generated by PCR with oligonucleotide primers iso6 (5'-GCCACTATAACAC-CCGATG-3') and iso1 (5'-CGTACGTTATTTTAAAGCCTG-3') and the plasmid pSRF-IDP3 as template, using a random-primed labeling kit (Boehringer, Mannheim, Germany). High stringency hybridization according to Maniatis *et al.* (26) was performed to screen a YEp13-based yeast genomic library (27) that was kindly provided by M. Bolotin-Fukuhara. Two positive clones containing the IDP3 gene were isolated, and sequencing was directly performed on one of the plasmids, YEp13-IDP3, with an automatic sequencer (model 373A; Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), the DyeDesoxy terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems), and synthetic oligonucleotides. Both strands of the IDP3 gene were sequenced.

Disruption of the Genomic IDP3 Gene.—To construct a *idp3* null mutant, the entire IDP3 open reading frame was replaced by the *kanMX4* marker gene (28). The PCR-derived construct for disruption comprised the *kanMX4* gene flanked by short (40-base pair) homology regions to the IDP3 3'- and 5'-noncoding region. PCR primers were 5'-CACAAGCAACACTTTAGAGATAGTTGTCCAAGTTAAAATGCG-TACGCTGCAGGTCGAC-3' (KU179) and 5'-GGCCAGACTTGTCTTT-TCAAATGAATGGCGGATTGGTTTAATCGATGAATTCGAGCTCG-3' (KU180), and plasmid pFA6a-*kanMX4* served as template. The resulting amplification construct was introduced into *S. cerevisiae* wild-type UTL-7A, the *idp1Δ* mutant (17), and the *idp1Δ/idp2Δ* double mutant (18). Geneticin-resistant clones were selected by growth on YPD plates containing 200 mg/liter G418 (28).

¹ The abbreviations used are: HPLC, high pressure liquid chromatography; PCR, polymerase chain reaction; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PTS1, peroxisomal targeting signal 1.

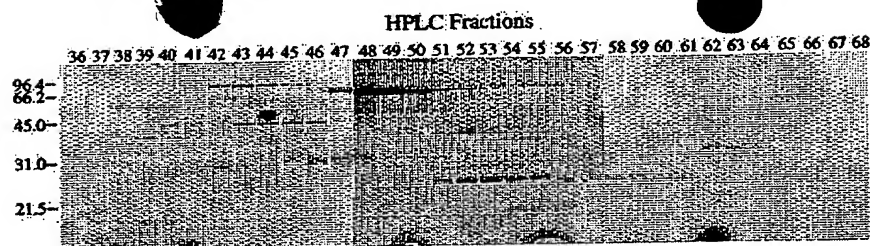


Fig. 2. Preparative chromatographic separation of peroxisomal membrane proteins. High salt-extracted peroxisomal membranes (1 mg of protein) were solubilized in SDS and separated by reverse phase HPLC. Polypeptides of selected fractions were separated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie Blue staining. The band of Idp3p is indicated by the arrowhead. The amount per lane corresponded to 5% of the total fraction. Molecular mass standards are indicated on the left.

Antibodies and Immunoblots.—For generating antibodies against Idp3p, the *IDP3*-fragment *IDP3** (144–210 amino acids) was amplified by PCR using GenBank™ plasmid YEp13-*IDP3* and oligonucleotides KU188 (5'-CCGGAATTCGGGATCCGATCAAGATTAAGCA-3') and KU189 (5'-TGCTCTAGACTGCAGCTACTCGACTGTAAAGATTAACGGTAG-3'). The PCR product was digested with *EcoRI* and *XbaI* and inserted into pBluescript SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) to create pSKIDP3*. The *BamHI/HindIII* fragment of pSKIDP3* was subcloned into pET21b (Novagen), leading to plasmid pET-IDP3*. The plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21-DE3, resulting in an isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside-inducible expression of HIS₆-tagged Idp3p*. The tagged Idp3p* was purified by affinity chromatography on a nickel-nitrilotriacetic acid resin (Quiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Rabbit polyclonal antibodies to HIS₆-tagged Idp3p* were produced by Eurogentec (Seraing, Belgium) according to standard methods (29).

Anti-thiolase (Fox3p), anti-Kar2p, anti-Pcs60p, anti-Pex14p, and anti-Pex3p antibodies have been described previously (30–34). Anti-rabbit or anti-mouse IgG-coupled horseradish peroxidase (Amersham Corp.) were used as the second antibody, and blots were developed using the ECL system (Amersham). Western blot analyses were performed according to standard protocols (29).

Construction and Expression of Idp3p Δ CKL.—To construct a Idp3p Δ CKL, the *IDP3* gene was amplified by PCR using plasmid YEp13-*IDP3* (see above) and oligonucleotides KU308 5'-CCGCTCGAGGGCTGGTGAAAGACAGT-3' and KU311 5'-CGCGGATCCTTACATACCTTTCTGTCTTCAT-3'. The amplification product was isolated and subcloned (*BamHI/XhoI*) into the vector pRSterm, a pRS16 derivative (35) that contained the *HincII/KpnI*-prepared *CYC1* terminator of pTerm1 (36). The resulting plasmid pRS-IDP3 Δ CKL was transformed into *idp3 Δ* , resulting in an expression of Idp3p Δ CKL under the control of its own promoter.

Cell Fractionation.—Spheroplasting of yeast cells, homogenization, and differential centrifugation at 25,000 \times *g* of homogenates were performed as described previously (19).

For subfractionation by isopycnic sucrose density gradient centrifugation, cell lysates or organellar pellets were loaded onto linear 20–53% sucrose density gradients (34). Centrifugation, fractionation of gradients, and preparation of the samples for SDS-PAGE were carried out as described (24).

The suborganellar localization of proteins was determined by extraction of 25,000 \times *g* organellar pellets with low salt (10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 1 mM PMSF), high salt (10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 500 mM KCl; 1 mM PMSF), or pH 11 buffer (0.1 M Na₂CO₃, 1 mM PMSF) as described by Erdmann and Blobel (37).

Protease Protection.—Peroxisomal peak fractions from a sucrose density gradient were pooled and diluted five times in gradient buffer (34). Peroxisomes were sedimented at 25,000 \times *g* for 30 min and subsequently resuspended in homogenization buffer (19) without protease inhibitors but supplemented with 50 mM KCl. Equal amounts of isolated peroxisomes were incubated with increasing amounts of proteinase K for 10 min on ice. Protease was inactivated immediately after the incubation with 4 mM PMSF, proteins were precipitated with trichloroacetic acid, and samples were processed for SDS-PAGE.

Heterologous Expression, Purification, and Characterization of Idp3p.—The *IDP3*-orf was amplified by PCR using plasmid YEp13-*IDP3* as template and oligonucleotides KU235 (5'-CGGAATTCATATGAGTAAATTAAGTTGTT-3') and KU236 (5'-CCCTCGAGTAGTTTGCA-CATACCTTTC-3'). The PCR product was digested with *EcoRI* and *XhoI* and subcloned into pET21b (Novagen), leading to plasmid pET-IDP3. The plasmid was introduced into *E. coli* BL21-DE3, resulting in an isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside-inducible expression of HIS₆-

tagged Idp3p. The tagged Idp3p was purified by affinity chromatography on a nickel-nitrilotriacetic acid resin (Quiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol.

Analytical Procedures.—NADP-specific isocitrate dehydrogenase activity was determined as described by Loftus *et al.* (18). Catalase and fumarase were assayed as described by Moreno de la Garca *et al.* (38). $\Delta 3, \Delta 2$ -Enoyl-CoA isomerase was assayed spectrophotometrically at 340 nm in a coupled assay (39) with 3-*trans*-decanoyl-CoA as substrate. 2,4-Dienoyl-CoA reductase activity was determined spectrophotometrically at 340 nm with 2-*trans*-4-*trans*-decanoyl-CoA as substrate according to Kunau and Dommes (12). Total protein was measured by the BCA method (Pierce) using bovine serum albumin as a standard.

RESULTS

Isolation and Identification of Idp3p.—Peroxisomes were isolated from oleic acid-induced *S. cerevisiae* cells and successively extracted by low and high salt treatments. The proteins of high salt extracted peroxisomes were solubilized with SDS and separated by HPLC and SDS-PAGE (Fig. 2). Lys-C-derived internal fragments of the 45-kDa protein marked in Fig. 2 were subjected to amino-terminal protein sequencing in preparation for DNA cloning and sequencing of the corresponding gene (see "Experimental Procedures"). The open reading frame of the isolated DNA fragment encoded a new protein with a calculated molecular mass of 48 kDa (Fig. 3) that later on also appeared in the yeast genome data base as open reading frame YNL009w. A search of the GenBank™ data base with the predicted amino acid sequence of *IDP3* revealed the yeast genes *IDP1* (17) and *IDP2* (18) as close relatives of the newly identified gene, hereafter referred to as *IDP3*. The overall identity of Idp3p with Idp1p and Idp2p is 68 and 70%, respectively (Fig. 4). Idp1p and Idp2p represent the two NADP-dependent isocitrate dehydrogenases reported for *S. cerevisiae* to date. Idp2p is localized in the yeast cytosol, and Idp1p is a mitochondrial isoenzyme that differs from the other two proteins by an N-terminal extension, which functions as a mitochondrial targeting signal (Fig. 4) (18, 40). Idp3p lacks the mitochondrial targeting signal and instead is characterized by an additional nine amino acids at the extreme C terminus. These terminal amino acids of Idp3p comprise the tripeptide cysteine-lysine-leucine (CKL; Fig. 3), a putative peroxisomal targeting signal 1 (PTS1) for *S. cerevisiae* (41, 42). The prominent presence in the HPLC profile of peroxisomal proteins (Fig. 2), the sequence similarity to Idp1p and to Idp2p (Fig. 4), and the presence of the putative peroxisomal targeting signal (PTS1; Fig. 3) suggested that Idp3p might be a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase.

IDP3 Is Induced upon Growth on Oleic Acid.—Antibodies were generated against an internal fragment of Idp3p comprising amino acids 144–210, which displays the lowest similarity of the protein to Idp1p and Idp2p (Fig. 4). A polypeptide with the predicted molecular mass for Idp3p (48 kDa) was detected in wild-type but not in *idp3 Δ* yeast extracts (Fig. 5A). Although binding of the antibodies to other proteins was observed under low stringency conditions, none of these bands disappeared in

[illegible]

FIG. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *S. cerevisiae* *IDP3* locus. A putative oleic acid response element (43) and a presumptive TATA sequence (54) in the 5'-noncoding region are underlined. The underlined amino acid sequences were obtained by peptide sequencing of protein fragments derived by Lys-C digestion of the isolated *Idp3p*. The putative PTS1 of the C terminus is double underlined.

mutants lacking either Idp1p or Idp2p, indicating that the antibodies generated do not recognize Idp1p or Idp2p but are specific for Idp3p (Fig. 5A).

In *S. cerevisiae*, growth on oleic acid results in a massive proliferation of peroxisomes accompanied by the induction of peroxisomal enzymes involved in peroxisomal fatty acid degradation (7, 10). The oleic acid induction is mediated by the transcription activator Pip2p, which binds to a well defined oleic acid-responsive element at the promoter of several peroxisomal proteins (43). A perfect consensus sequence for Pip2p binding is also present upstream of the *IDP3* open reading frame (position -311 to -289; Fig. 3), and *I*dp3p was found to be highly inducible by oleic acid (Fig. 5B), supporting the assumption of *I*dp3p being involved in peroxisomal fatty acid degradation.

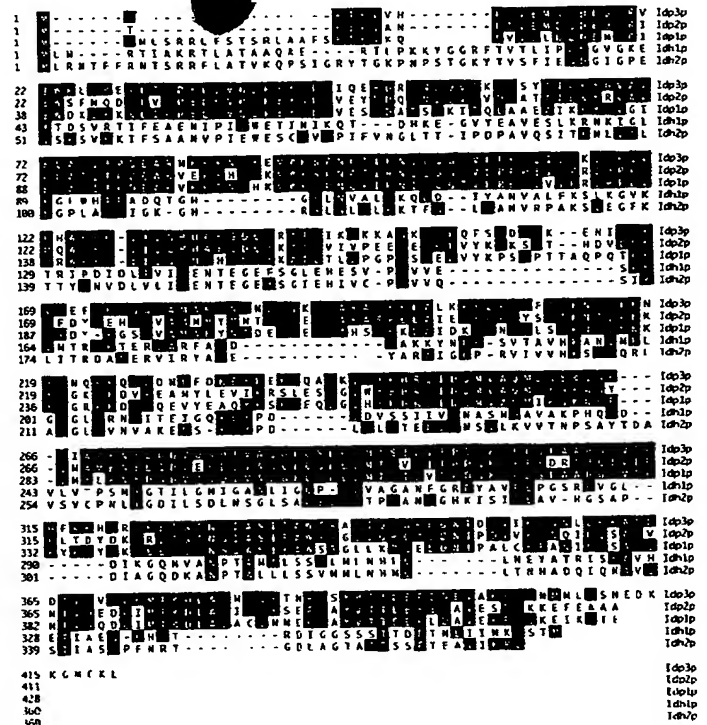


FIG. 4. Comparison of the deduced amino acid sequence of *S. cerevisiae* Idp3p with other isocitrate dehydrogenases from *S. cerevisiae*. The mitochondrial Idp1p (17) and the cytosolic Idp2p (18) are both NADP-dependent isocitrate dehydrogenases. The Idh1p (47) and Idh2p (48) are subunits of the heteromeric mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. Alignment was performed with the BESTFIT program (EMBL, Heidelberg). Amino acids conserved in Idp3p and at least one of the other proteins are blocked.

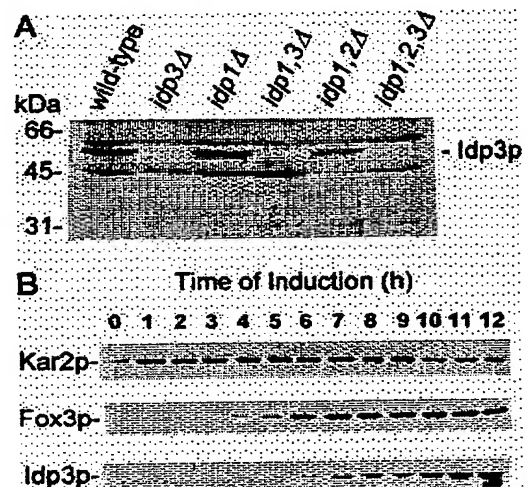


FIG. 5. Immunological detection of Idp3p and time course of Idp3p induction by oleic acid. *A*, equal amounts of whole-cell lysates from oleic acid-induced wild type and indicated single, double, or triple (*idp1Δ*, *idp2Δ*, or *idp3Δ*) mutant cells were subjected to Western blot analysis with rabbit antiserum against Idp3p. The amount loaded corresponds to 0.5% of extracts from 30 mg of cells. *B*, wild-type cells were precultured in 0.3% SD and subsequently shifted to oleic acid-containing medium. At the indicated time points, whole-cell extracts were prepared for immunological detection of oleic acid-inducible Fox3p (30), constitutively expressed Kar2p (31), and Idp3p. The amounts loaded correspond to 0.3 mg of cells.

Peroxisomes of *S. cerevisiae* Contain an NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase—The subcellular localization of NADP-dependent isocitrate dehydrogenases in *S. cerevisiae*

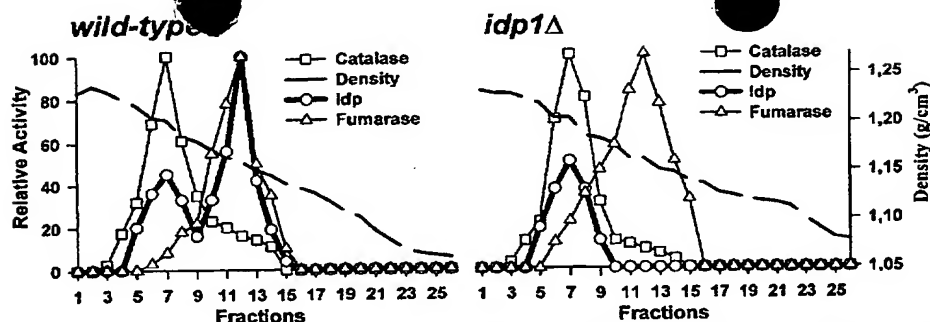


FIG. 6. Organellar localization of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes in wild-type and *idp1Δ* mutant cells. Organelles obtained by a $25,000 \times g$ centrifugation of cell homogenates from oleic acid-induced wild-type and *idp1Δ* mutant cells were separated on isopycnic 20–53% (w/w) sucrose density gradients. Fractions of 1 ml were collected from the bottom of the gradients. Relative amounts of the peroxisomal marker enzyme catalase and the mitochondrial fumarase as well as NADP-dependent isocitrate dehydrogenase were monitored by activity measurements. Peroxisomes peaked in fraction 7 at a density of 1.21 g/ml, and mitochondria peaked in fraction 12 at a density of 1.18 g/ml. NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity was detected in both peroxisomal and mitochondrial fractions of the wild-type lysate but only in peroxisomal fractions of the *idp1Δ* lysate.

was first analyzed by differential centrifugation of cell homogenates from oleic acid-induced wild-type yeast cells. More than 60% of the Idp activity was found in the supernatant fraction, suggesting that the cytosolic isoform might be responsible for the majority of the endogenous enzyme activity (data not shown). Sedimented organelles were further fractionated by sucrose density gradient centrifugation. NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity was found in both the mitochondrial and the peroxisomal fractions (Fig. 6). The peroxisomal peak, however, comprised a smaller fraction of the total particular enzyme activity. To exclude the possibility that the activity found in the peroxisomal fraction was due to a mitochondrial contamination, the subcellular localization of the enzymes was also analyzed in a *idp1Δ* mutant strain, lacking the mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. After differential centrifugation of cell homogenates of the *idp1Δ* mutant strain, about 15% of the total NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity was still localized to the organellar fraction. Subsequent sucrose density gradient fractionation confirmed the absence of the mitochondrial enzyme and demonstrated the activity to exclusively co-segregate with peroxisomal marker enzymes (Fig. 6), consistent with the presence of a peroxisomal isoenzyme of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenases in *S. cerevisiae*.

The Peroxisomal NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase Activity Is Performed by Idp3p—As a first step to analyze whether the peroxisomal NADP-dependent isocitrate activity is due to Idp3p, we studied the subcellular localization of the protein. Immunological detection of Idp3p in fractions generated by differential centrifugation of yeast cell homogenates revealed that the protein is exclusively found in the organellar pellet (Fig. 7A). Immunoblot analysis of fractions gained by subsequent sucrose density gradient centrifugation of the organellar pellets demonstrated the protein to be exclusively localized in the peroxisomal fractions (Fig. 7B). In agreement with Idp3p being responsible for the peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity, the absence of this protein in *idp3Δ* mutant cells correlated with the disappearance of the enzyme activity in the organellar pellet and in the peroxisomal fractions of sucrose density gradients (Fig. 7).

The sequence similarity of Idp3p to the two NADP-dependent isocitrate dehydrogenases suggested that the protein Idp3p itself is an NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. However, to confirm that the lack of the peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity upon *IDP3* deletion is not caused indirectly, the protein was heterologously expressed in *E. coli*, and the enzyme properties of isolated Idp3p were analyzed. Transformation of *E. coli* with a plasmid carrying the

IDP3 gene under the control of the bacterial promoter resulted in a massive increase in NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity in bacterial lysates accompanied by the appearance of immunoreactive Idp3p (Fig. 8A). Taking advantage of the C-terminal histidine tag, the protein was purified to apparent homogeneity as judged by SDS-PAGE. The isolated Idp3p showed a specific NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity of 1654 nanokatal/mg. Since expression of Idp3p did result in the concomitant appearance of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity in bacterial extracts and since the enzyme activity was retained by purified Idp3p, these data confirmed Idp3p to be the yeast peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (Fig. 8B).

A set of kinetic properties of the Idp3p enzyme activity were studied with the recombinant yeast protein purified from *E. coli* extracts. The enzyme activity did strongly depend on the presence of NADP⁺ that could not be replaced by NAD⁺ (data not shown). The K_m values for NADP⁺ and isocitrate were 0.02 and 0.05 mM, respectively (Fig. 9), and are in the range of those reported for the peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase of *Candida tropicalis* (0.016 mM for NADP and 0.11 mM for isocitrate) (44).

Idp3p Is Localized in the Peroxisomal Lumen—An organellar fraction isolated from spheroplasts of yeast wild-type cells was subjected to extraction by low salt, high salt, and carbonate at pH 11 according to Ref. 37. Idp3p was resistant to low salt extraction but was released by high salt and carbonate treatment of the organelles (Fig. 10A). These extraction properties distinguished Idp3p from two other peroxisomal proteins. Pex3p was resistant to all treatments, consistent with it being an integral membrane protein (34). As expected for a matrix protein, peroxisomal thiolase (Fox3p) (30) was extracted by all treatments. The extractability of Idp3p by carbonate treatment suggested that Idp3p does not span the peroxisomal membrane. Idp3p also does not seem to be tightly associated with the peroxisomal membrane, since part of the protein could be extracted with high salt. The extraction properties of Idp3p are similar to those observed for Pcs60p, a protein of the peroxisomal matrix that is also loosely associated with the peroxisomal membrane (32). To distinguish whether Idp3p is associated with the outer aspects of peroxisomes or whether the protein resides in the peroxisomal lumen, we analyzed the sensitivity of organellar Idp3p to externally added proteases. In the presence of detergents and proteases, all proteins were rapidly degraded. When detergents were present, degradation of proteins was also observed without the addition of protease, presumably due to the liberation of endogenous proteases (data not shown). However, in the absence of detergents, both the

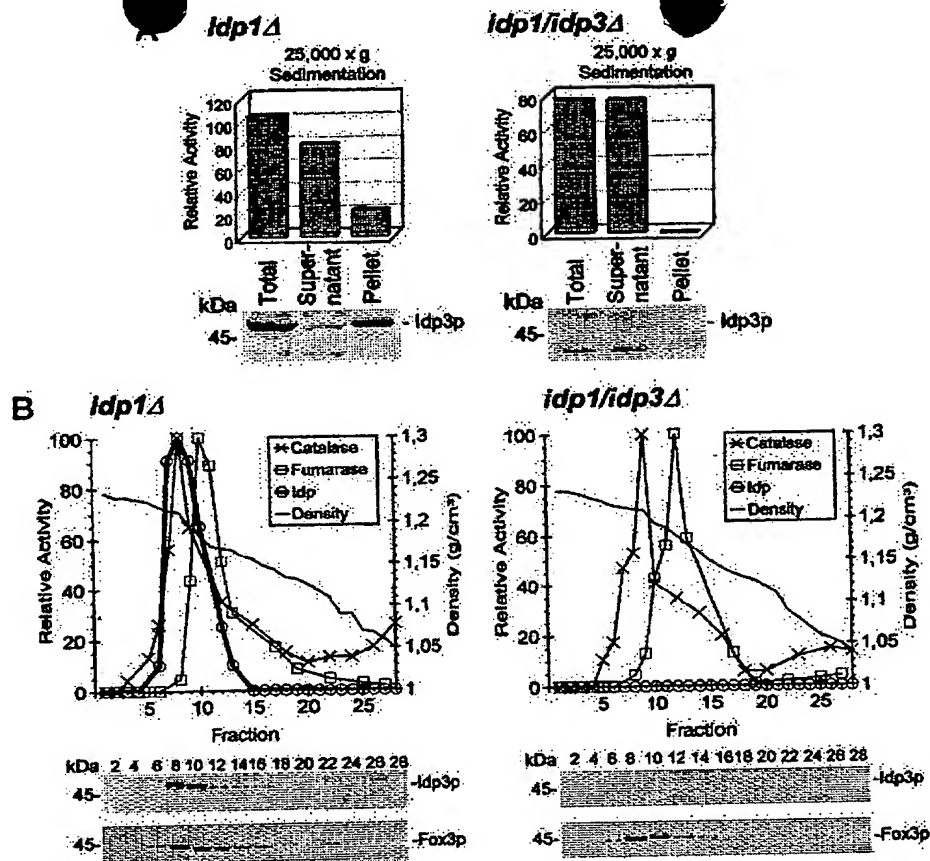


FIG. 7. Idp3p is localized in yeast peroxisomes and is required for the peroxisomal oxidative decarboxylation of isocitrate. A, immunoblot analysis and enzyme activity measurements of cell fractions that were obtained by differential centrifugation of cell-free extracts from oleic acid-induced *idp1Δ* and *idp1/idp3Δ* cells. Equal volumes of each fraction were immunologically analyzed for the presence of Idp3p. In parallel, the fractions were assayed for NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity. Idp3p was exclusively localized to the organellar fraction of the *idp1Δ* cells but was absent in *idp1/idp3Δ* cells. In *idp1Δ* cells, about 80% of the total enzyme activity was found in the soluble fraction. In *idp1/idp3Δ* cells, the deficiency in Idp3p correlated with the disappearance of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity from the organellar fraction. B, correlation of Idp3p presence and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity in peroxisomal fractions obtained by isopycnic 20–53% (w/w) sucrose density gradient centrifugation of organelles of the 25,000 × g pellet from oleic acid-induced *idp1Δ* and *idp1/idp3Δ* cells. Equal volumes of each fraction were immunologically analyzed for the presence of Idp3p and thiolase. Relative amounts of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase and peroxisomal marker enzymes catalase and mitochondrial fumarase were monitored by enzyme activity measurements. Peroxisomes peaked at a density of 1.21 g/ml, and mitochondria peaked at a density of 1.17 g/ml. Idp3p was found predominantly in the peroxisomal peak fractions of *idp1Δ* cells but was absent in *idp1/idp3Δ* cells. No NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity was detected in peroxisomes lacking the Idp3p.

intraperoxisomal thiolase (Fox3p) and Idp3p were protected against added proteases (Fig. 10B). Under the same conditions, Pex14p, which is located at the cytosolic face of the peroxisomal membrane (33), was rapidly degraded. Taken together, these results are consistent with an intraperoxisomal localization of Idp3p.

Peroxisomal Targeting of Idp3p Depends on the Presence of the Three C-terminal Amino Acids—The amino acids CKL at the extreme C terminus of Idp3p fit the consensus for a yeast PTS1 (41, 42). To analyze whether this putative PTS1 of Idp3p is functional, we analyzed the subcellular localization of a mutated Idp3pΔCKL lacking the last three amino acids. Idp3pΔCKL was expressed in an *idp3Δ* strain, and localization of the protein was determined by subcellular fractionation of whole-cell homogenates on sucrose density gradients. Idp3pΔCKL did not co-segregate with the peroxisomal markers but instead was exclusively found in the loading zone of the gradient, suggesting a cytosolic localization of the protein (data not shown). This result indicated that the last three amino acids of Idp3p are essential for the peroxisomal targeting of the protein. The presence of a functional PTS1 in Idp3p is in line with the observed protease resistance of the protein (Fig. 10B), since this signal sequence is known to target proteins to the

peroxisomal matrix (41, 45).

Idp3p Is Required for the Peroxisomal Degradation of Unsaturated Fatty Acids—In search for the function of Idp3p in peroxisomal metabolism, we tested the growth abilities of *idp3Δ* cells on different carbon sources. Cells grew normally on medium containing glucose, glycerol, or stearate as a single carbon source (Fig. 11A). Also, on oleic acid plates, no significant growth differences between wild-type and *idp3Δ* mutant cells were observed (Fig. 11B). In liquid oleic acid medium, however, the generation time of *idp3Δ* mutant cells increased from 8 h as determined for the wild type to 12 h for the mutant (Fig. 11B). Because the only difference between stearic acid and oleic acid is the presence of one double bond in position 9, the observed growth defect suggested that the peroxisomal Idp3p might play a role in the degradation of unsaturated fatty acids. This assumption was further supported by the complete inability of cells lacking Idp3p to grow on petroselinic acid, an unsaturated fatty acid that contains a double bond at position 6 (Fig. 11C). The observed growth defects on oleic acid and petroselinic acid medium were complemented upon transformation of the *idp3Δ* mutant with the wild-type *IDP3* gene (Fig. 11, B and C). These results confirmed that the impaired growth of *idp3Δ* mutant cells on unsaturated fatty acids was indeed

caused by the lack of Idp3p.

Yeast Peroxisomes Contain Auxiliary Enzymes Needed for the Degradation of Unsaturated Fatty Acids—The ability of *S. cerevisiae* to grow on unsaturated fatty acids as the single carbon source (Fig. 11), the presence of an NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in peroxisomes (Fig. 6), and its suggested role of supplying NADPH for the degradation of unsaturated fatty acids encouraged us to search for auxiliary enzymes of this pathway. Both the $\Delta 2, \Delta 3$ -enoyl-CoA isomerase and the NADP-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase activities were detected in whole-cell yeast lysates (data not shown). For subcellular localization of the activities, wild-type yeast homogenates were subjected to sucrose density gradient centrifugation, which did result in a clear separation of peroxisomes and mitochondria as judged by organelle-specific marker enzymes (Fig. 12). Both the $\Delta 2, \Delta 3$ -enoyl-CoA isomerase and the NADP-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase activities co-segregated with the peroxisomal marker catalase, demonstrating that both enzymes are localized in peroxisomes of *S. cerevisiae* (Fig. 12). These data

suggest that peroxisomes of *S. cerevisiae* harbor the entire enzyme equipment needed for the utilization of unsaturated fatty acids, including an NADP-dependent isocitrate dehydrogenase, a putative component of an NADPH-regenerating system.

DISCUSSION

Here we report on the molecular identification and functional characterization of a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase of *S. cerevisiae*. In line with a role in the peroxisomal metabolism of unsaturated fatty acids, the Idp3p has been demonstrated to be exclusively peroxisomal, and the protein was shown to be essential for the growth of *S. cerevisiae* on unsaturated fatty acids but dispensable for growth on saturated fatty acids. The supposed function of the protein in peroxisomal fatty acid metabolism is the regeneration of NADPH that is needed by the NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase for the reductive elimination of double bonds of unsaturated fatty acids. This reductase and the $\Delta 2, \Delta 3$ -enoyl-CoA isomerase, another auxiliary enzyme needed for the degradation of unsaturated fatty acids, have been localized to yeast peroxisomes (Fig. 12). The presence of these enzyme activities in peroxisomes has far reaching implications for our understanding of the peroxisomal metabolism and transport of metabolites across the peroxisomal membrane. The data presented are consistent with the assumption that peroxisomes of *S. cerevisiae* maintain the entire enzyme equipment needed for the degradation of unsaturated fatty acids, including an NADP-dependent isocitrate dehydrogenase, a putative constituent of a peroxisomal NADPH-regenerating redox system.

Idp3p was isolated from peroxisomes of oleic acid-induced yeast cells (Fig. 2), and peptide sequence data of the protein were instrumental in cloning the corresponding gene from a genomic yeast library (Fig. 3). Idp3p is exclusively localized in peroxisomes, and consistent with its function in peroxisomal fatty acid metabolism, Idp3p was highly induced upon growth on oleic acid (Figs. 5–7). Protease protection data suggested that the protein resides in the peroxisomal lumen (Fig. 10), which is further supported by the observation that peroxisomal targeting of Idp3p depends on the presence of a C-terminal type 1 peroxisomal targeting signal (data not shown), known to target proteins from the cytosol across the peroxisomal membrane barrier into the peroxisomal matrix (41, 45, 46). That the peroxisomal Idp3p indeed is an NADP-dependent isocitrate dehydrogenase was confirmed by the characterization of the enzymatic properties of purified, recombinant Idp3p (Fig. 8). Interestingly, an NADP-dependent isocitrate dehydrogenase has also been detected in peroxisomes of the *n*-alkane-utilizing yeast *C. tropicalis* (44).

Beside the peroxisomal Idp3p, three yeast isoenzymes of isocitrate dehydrogenase have been described that catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate to α -ketoglutarate. The NAD-specific mitochondrial isoenzyme is an octamer of two nonidentical subunits designated Idh1p and Idh2p (47, 48) and is believed to catalyze a key regulation step in the tricarboxylic

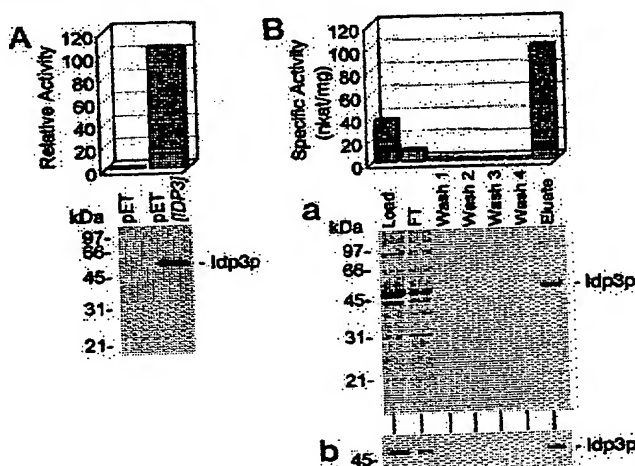
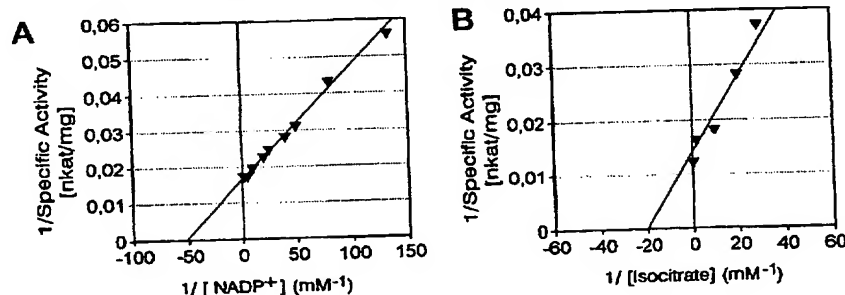


FIG. 8. Idp3p is a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. A, cell homogenates from *E. coli* BL21(DE3) transformed with the pET vector or pET-IDP3 were analyzed for the presence of Idp3p and of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity. Equal amounts of cell homogenates were subjected to immunoblot analysis with Idp3p antibodies and to enzyme measurements. Immunoreactive Idp3p was only detected in *E. coli* transformants expressing IDP3, and expression correlated with the appearance of specific NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity in the bacterial extracts. B, HIS₆-tagged Idp3p from bacterial extracts of *E. coli* BL21(DE3) was purified by affinity chromatography on nickel-nitrilotriacetic acid resin (see "Experimental Procedures"). The block diagram shows the specific activity of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase of equal portions of the bacterial homogenate (load), the column flow-through (FT), four steps of washing (washes 1–4), and the eluate. Equal portions of the fractions were processed for SDS-PAGE and Coomassie staining (a) and immunoblot analysis with antibodies against the Idp3p (b). As judged by SDS-PAGE and immunoblot analysis, purification of Idp3p was to apparent homogeneity, and the purified protein retained the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity. *nkatal*, nanokatal.

FIG. 9. Kinetic properties of Idp3p. Idp3p activities at different NADP (A) and isocitrate (B) concentrations are shown as Lineweaver-Burk plots. The resulting apparent K_m values for NADP and isocitrate are 0.02 mM and 0.05 mM, respectively.



acid cycle. Less clear are the functions of the two NADP-specific isoenzymes located in mitochondria and the cytosol (17, 18). The glutamate auxotrophy upon deletion of both *Idp1p* and *Idh1p* suggest that both enzymes contribute to the anaplerotic supply of α -ketoglutarate for glutamate formation (40). Furthermore, as isocitrate and α -ketoglutarate can traverse the mitochondrial membrane via specific transporters (49), it has been suggested that the proteins may participate in an inter-

compartmental exchange of reducing equivalents (18). This raises the question of whether *Idp3p* might play a comparable role in the peroxisomal metabolism. In the cytosol, NADPH is generated by, for instance, the pentose phosphate pathway. However, because of the impermeability of the peroxisomal membrane for pyrimidine nucleotides (15), the cytosolic NADPH pool cannot directly account for the peroxisomal need for NADPH. This emphasizes the necessity for an NADPH-regenerating system in the peroxisomal lumen. Because the formation of α -ketoglutarate for the production of glutamate is primarily catalyzed by the yeast mitochondrial NAD-dependent and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases (40), the most likely biological function of *Idp3p* is the regeneration of NADPH. The involvement of *Idp3p* in the intraperoxisomal regeneration of NADPH, which is necessary for the degradation of unsaturated fatty acids, is also more in agreement with the peroxisomal localization and with the oleic acid inducibility of the protein.

The requirement of the peroxisomal degradation of fatty acids with even-numbered double bonds for NADPH is well established (8, 12). Degradation of these fatty acids in the β -oxidation spiral leads to 2,4-dienoyl-CoA intermediates that are reduced to 3-*trans*-enoyl-CoA in a redox reaction that requires NADPH and that is catalyzed by the peroxisomal NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase. The resulting 3-*trans*-enoyl-CoA is subsequently isomerized to 2-*trans*-enoyl-CoA, which can be reintroduced into the β -oxidation spiral (Fig. 1). The assumption that *Idp3p* provides the NADPH for this chain of reactions is supported by the observation that cells lacking the protein grow normally on stearate (C18:0) but have lost the ability to grow on petroselinic acid ($\Delta 6$ -C18:1; Fig. 11).

Until recently, it was generally believed that unsaturated fatty acids with double bonds extending from odd-numbered carbon atoms are chain-shortened to 3-*cis*-enoyl-CoA esters, which after isomerization to 2-*trans*-enoyl-CoA are further degraded by the β -oxidation spiral (Fig. 1B) (11). According to this pathway, NADPH would not be needed for the metabolism of these unsaturated fatty acids (Fig. 1). However, Tserng and Jin (50) reported that in mammalian cells also the degradation

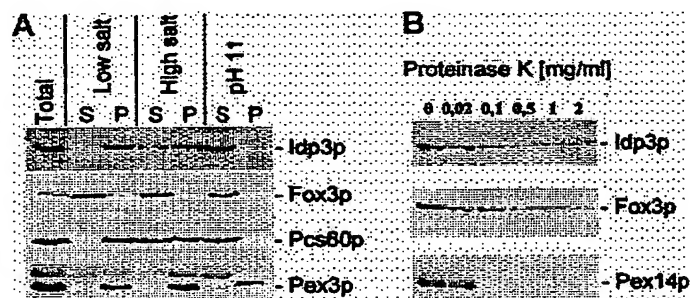


FIG. 10. Subperoxisomal localization of *Idp3p*. A, extraction of peroxisomes. 25,000 $\times g$ organelle pellets were prepared from oleic acid-induced wild-type cells and extracted by low salt, high salt, and carbonate treatment at pH 11.0. Extracted proteins were separated from the membranes by centrifugation. Equal proportions of pellet (P) and supernatant (S) fractions were analyzed by SDS-PAGE and Western blot analysis using specific antibodies against *Idp3p*, the integral membrane protein *Pex3p* (34), *Pcs60p* (32), and the peroxisomal matrix marker *Fox3p* (30). As *Idp3p* is hardly extracted by high salt treatment and totally extracted at pH 11, it behaves like *Pcs60p*, which is localized in the peroxisomal matrix but is also found loosely associated with the peroxisomal membrane (32). B, protease protection analysis of purified peroxisomes. A cell homogenate of wild-type cells was separated by sucrose density gradient centrifugation, and peroxisomal peak fractions were pooled. Equal amounts of the pooled peroxisomal fractions were incubated in the presence or absence of proteinase K for 10 min on ice. Samples were analyzed by SDS-PAGE and Western blot analysis using antibodies against *Idp3p*, *Pex14p*, and *Fox3p*. The resistance of *Idp3p* against externally added protease suggests that the protein is protected by the peroxisomal membrane and thus resides in the peroxisomal lumen. In contrast, *Pex14p*, a peripheral membrane protein localized at the cytosolic face of the peroxisomal membrane (33), is rapidly degraded under these conditions.

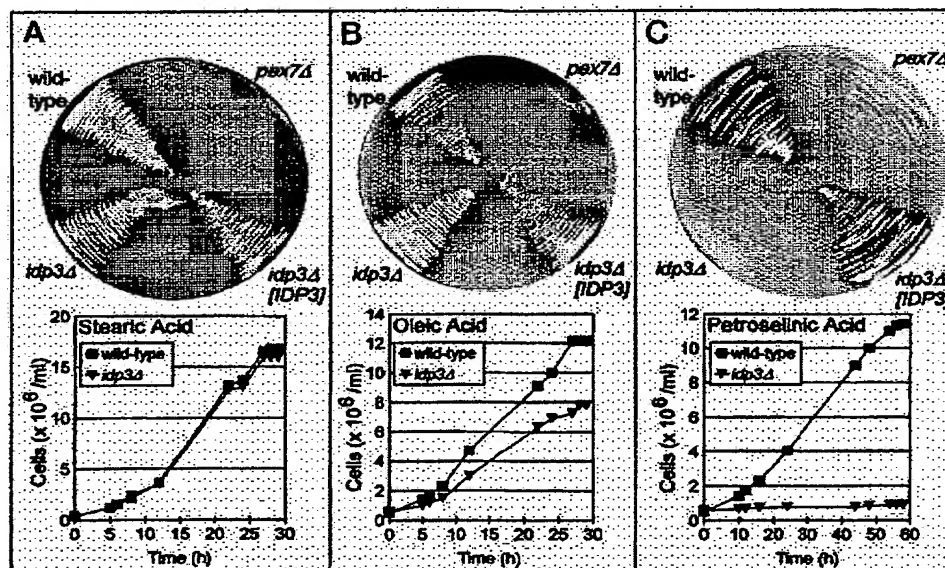


FIG. 11. The peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase *Idp3p* is required for growth on unsaturated fatty acids. Growth kinetics from wild-type and *idp3Δ*, *idp3Δ/IDP3*, and *pex7Δ* mutant cells on solid agar plates (upper panels) as well as wild-type and *idp3Δ* cells on liquid media (lower panels) containing stearic acid (A), oleic acid (B), or petroselinic acid (C) as a single carbon source. The growth of cells lacking the *Idp3p* was severely affected on oleic acid media and completely impaired on petroselinic acid-containing media. Growth abilities of *idp3Δ* mutant cells complemented with the *IDP3* gene were indistinguishable from those of the wild type.

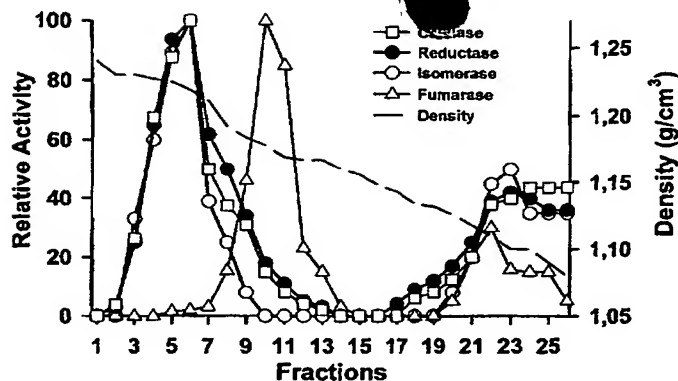


FIG. 12. Yeast peroxisomes harbor the auxiliary enzymes 2,4-dienoyl-CoA reductase and enoyl-CoA isomerase for the degradation of unsaturated fatty acids. Fractions were obtained by isopycnic 20–53% (w/w) sucrose density gradient centrifugation of cell-free extracts from oleic acid-induced wild-type cells. Relative amounts of the peroxisomal marker enzyme catalase and mitochondrial fumarase as well as 2,4-dienoyl-CoA reductase and enoyl-CoA isomerase were monitored. Peroxisomes peaked in fraction 6 at a density of 1.21 g/ml, and mitochondria peaked in fraction 11 at a density of 1.18 g/ml. 2,4-Dienoyl-CoA reductase and enoyl-CoA isomerase activities co-segregated with the peroxisomal marker enzymes, suggesting that both enzymes are localized in peroxisomes.

of unsaturated fatty acids with double bonds extending from odd-numbered carbon atoms requires NADPH. This observation gained support by the exploration of a novel pathway for the reductive removal of odd-numbered double bonds of fatty acids (Fig. 1C) (13). According to this pathway, a $\Delta 3,5,\Delta 2,4$ -dienoyl-CoA isomerase, together with the NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase and the $\Delta 3,\Delta 2$ -dienoyl-CoA isomerase facilitate the reduction of odd-numbered double bonds as illustrated in Fig. 1. Recently, it has been suggested that this novel pathway might also be responsible for the degradation of odd-numbered double bonded fatty acids in mammalian peroxisomes (8, 14). In this respect, it is interesting to note that also yeast cells lacking *Iidp3p* are less capable than the wild type of growing on oleic acid ($\Delta 9$ -C18:1) as the single carbon source (Fig. 11).

The peroxisomal localization of the *Iidp3* leads to questions about the origin of the isocitrate and the fate of the α -ketoglutarate that is produced. The most simple explanation would be that α -ketoglutarate is exported directly in exchange for isocitrate as has been demonstrated for mitochondria (49). In principle, isocitrate could also form in peroxisomes from the citrate that is generated by the fusion of acetyl-CoA with oxalacetate, catalyzed by the peroxisomal citrate synthase (*Cit2p*) (15, 51). However, despite efforts, an aconitase activity has not yet been detected in yeast peroxisomes, thus making the peroxisomal formation of isocitrate from citrate rather unlikely. The direct import of isocitrate from the cytosol into the peroxisomal lumen would predict the existence of a peroxisomal membrane transporter for isocitrate; however, experimental evidence for such a transporter is still missing. In general, our knowledge on the influx and efflux of peroxisomal metabolites and especially on the nature of the carriers involved is still rather limited. For *S. cerevisiae*, only two peroxisomal metabolite carriers have been described. The heterodimeric *Pat1p/Pat2p* ABC-transporter has been suggested to participate in the peroxisomal import of acyl-CoA esters (52), and the peroxisomal carnitin acetyl transferase is involved in the export of the β -oxidation-derived acetyl-CoA (15, 53).

The data presented here are consistent with the idea that peroxisomes of *S. cerevisiae* maintain the entire enzyme equipment needed for the degradation of unsaturated fatty acids,

including an NADPH-dependent isocitrate dehydrogenase, a putative constituent of a peroxisomal NADPH-regenerating redox system. The latter supports the notion of an involvement of peroxisomes in an intercompartmental exchange of reducing equivalents and predicts novel peroxisomal metabolite transporters as constituents of a redox shuttle across the peroxisomal membrane.

Acknowledgments—We thank Lee McAlister-Henn for providing the yeast *idp1* and *idp2* mutant strains. We thank Ulrike Freimann and Uta Ricken for technical assistance and Siegrid Wüthrich for photograph illustration service. We are grateful to Wolf-Hubert Kunau, Andreas Hartig, Rainer Rhodemann, and Ursula Dorpmund for reagent supply. We are grateful to Kai Erdmann, Peter Rehling, and Jürgen Saidowsky for fruitful discussions. We thank Gabi Dodt, Michael Schwierskott, and Michael Linkert for reading of the manuscript.

REFERENCES

- Tolbert, N. E. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50, 133–157
- van den Bosch, H., Schutgens, R. B. H., Wanders, R. J. A., and Tager, J. M. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61, 157–197
- Oppeides, F. R. (1988) *Trends Biochem. Sci.* 13, 255–260
- Lazarow, P. B., and Moser, H. W. (1995) in *The Metabolic Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 7th Ed., pp. 2287–2324, McGraw-Hill Inc., New York
- Cooper, T. G., and Beevers, H. J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3514–3520
- Lazarow, P. B., and DeDuve, C. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2043–2046
- Kunau, W.-H., Böhne, S., de la Garza, M., Kionka, C., Mateblowski, M., de la Garza, M., Schulz-Borchard, U., and Thieringer, R. (1988) *Biochem. Soc. Trans.* 16, 418–420
- Kunau, W.-H., Dommes, V., and Schulz, H. (1995) *Prog. Lipid Res.* 34, 267–342
- Hashimoto, T. (1982) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 386, 5–12
- Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W.-H., and Harder, W. (1987) *Yeast* 3, 77–84
- Stoffel, W., and Caesar, H. (1965) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 341, 76–83
- Kunau, W.-H., and Dommes, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* 91, 533–544
- Smeland, T. E., Nada, M., Cuevas, D., and Schulz, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6673–6677
- He, X.-Y., Shoukry, K., Chu, C., Yang, J., Sprecher, H., and Schulz, H. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 15–22
- van Roermund, C. W. T., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, J. A., and Tabak, H. F. (1995) *EMBO J.* 14, 3480–3486
- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M., and Kunau, W.-H. (1994) *EMBO J.* 13, 4908–4918
- Haselbeck, R. J., and McAlister-Henn, L. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 2339–2345
- Loftus, T. M., Hall, L. V., Anderson, S. L., and McAlister-Henn, L. (1994) *Biochemistry* 33, 9661–9667
- Erdmann, R., Veenhuis, M., Mertens, D., and Kunau, W.-H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5419–5423
- Erdmann, R., Wiebel, F. F., Flessau, A., Rytka, J., Beyer, A., Fröhlich, K. U., and Kunau, W.-H. (1991) *Cell* 64, 499–510
- Ausubel, F. J., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
- Yaffe, M. P., and Schatz, G. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4819–4823
- Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988) *Gene (Amst.)* 74, 527–534
- Erdmann, R., and Blobel, G. (1995) *J. Cell Biol.* 128, 509–523
- Fernandez, J., DeMott, M., Atherton, D., and Mische, S. M. (1992) *Anal. Biochem.* 201, 569–573
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp. 9.47–9.57, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Daignan-Fornier, B., Nguyen, C. C., Reisdorf, P., Lemeignan, B., and Bolotin-Fukuhara, M. (1994) *Mol. Gen. Genet.* 243, 575–583
- Wach, A., Brachat, A., Poehmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* 10, 1793–1808
- Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Erdmann, R., and Kunau, W.-H. (1994) *Yeast* 10, 1173–1182
- Rose, M. D., Misra, L. M., and Vogel, J. P. (1989) *Cell* 57, 1211–1221
- Blobel, F., and Erdmann, R. (1996) *Eur. J. Biochem.* 240, 468–476
- Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J. A. K. W., Veenhuis, M., and Kunau, W.-H. (1997) *Cell* 89, 83–92
- Höhfeld, J., Veenhuis, M., and Kunau, W.-H. (1991) *J. Cell Biol.* 114, 1167–1178
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) *Genetics* 122, 19–27
- Erdmann, R. (1994) *Yeast* 10, 935–944
- Erdmann, R., and Blobel, G. (1996) *J. Cell Biol.* 135, 111–121
- Moreno de la Garza, M., Schultz-Borchard, U., Crabbe, J. W., and Kunau, W.-H. (1985) *Eur. J. Biochem.* 148, 285–291
- Binstock, J. F., and Schulz, H. (1981) *Methods Enzymol.* 71, 403–411
- Haselbeck, R. J., and McAlister-Henn, L. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 12116–12122
- Gould, S. J., Keller, G.-A., and Subramani, S. (1987) *J. Cell Biol.* 105, 2923–2931
- Elgersma, Y., Vos, A., van den Berg, M., van Roermund, C. W., van der Sluis, J.

- P., Distel, B., and Tabak, H. F. (1991) *J. Biol. Chem.* **271**, 26375-26382
43. Rottensteiner, H., Kal, A. J., Filipits, M., Binder, M., Hamilton, B., Tabak, H. F., and Ruis, H. (1996) *EMBO J.* **15**, 2924-2934
44. Yamamoto, S., Atomi, H., Ueda, M., and Tanaka, A. (1995) *Arch. Microbiol.* **163**, 104-111
45. Subramani, S. (1993) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**, 445-478
46. McNew, J. A., and Goodman, J. M. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 54-58
47. Keys, D. A., and McAlister-Henn, L. (1990) *Bacteriology* **172**, 4280-4287
48. Cupp, J. R., and McAlister-Henn, L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22199-22205
49. LaNoue, K. F., and Jolwerth, A. C. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 871-922
50. Tserng, K. Y., and S. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11614-11620
51. Lewin, A. S., Hines, V., and Small, G. M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1399-1405
52. Hettema, E. H., van Roermund, C. W., Distel, B., van den Berg, M., Vilela, C., Rodrigues-Pousada, C., Wanders, R. J., and Tabak, H. F. (1996) *EMBO J.* **15**, 3813-3822
53. Elgersma, Y., van Roermund, C. W., Wanders, R. J., and Tabak, H. F. (1995) *EMBO J.* **14**, 3480-3486
54. Struhl, K. (1987) *Cell* **49**, 295-297

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|--|-----------|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12P 25/00, C12N 15/60, 15/31 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/03208 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Januar 1997 (30.01.97) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/03009 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Juli 1996 (10.07.96) (30) Prioritätsdaten: 195 25 281.0 13. Juli 1995 (13.07.95) DE 195 45 468.5 6. December 1995 (06.12.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; D-52428 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÄSLER, Bruno [DE/DE]; Magdeburger Strasse 72, D-67071 Ludwigshafen (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE). STAHMANN, Klaus-Peter [DE/DE]; Wilhelmstrasse 11, D-52428 Jülich (DE). SCHMIDT, Georg [DE/DE]; Heerstrasse 10, D-52457 Aldenhoven (DE). BÖDDECKER, Theo [DE/DE]; Robert-Koch-Strasse 7, D-52428 Jülich (DE). SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Adalbert-Stifter-Strasse 4, D-69221 Dossenheim (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |
| (54) Title: RIBOFLAVIN-PRODUCTION PROCESS BY MEANS OF MICRO-ORGANISMS WITH MODIFIED ISOCITRATLYASE ACTIVITY (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN MITTELS MIKROORGANISMEN MIT VERÄNDERTER ISOCITRATLYASE-AKTIVITÄT (57) Abstract <p>A microbial riboflavin-production process is disclosed. Riboflavin-producing micro-organisms are cultivated in a culture medium and the thus produced riboflavin is then isolated. The process is characterised in that the endogenous isocitratlyase activity (ICL) of the micro-organisms used has been modified.</p> (57) Zusammenfassung <p>Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin durch Kultivierung von Riboflavin produzierenden Mikroorganismen in einem Nährmedium und anschließender Isolierung des hergestellten Riboflavins, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen verwendet werden, bei denen die endogene Isocitratlyase (ICL) Aktivität verändert wurde.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AM | Armenien | GB | Vereinigtes Königreich | MX | Mexiko |
| AT | Österreich | GE | Georgien | NE | Niger |
| AU | Australien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BB | Barbados | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BE | Belgien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BF | Burkina Faso | IE | Irland | PL | Polen |
| BG | Bulgarien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BJ | Benin | JP | Japan | RO | Rumänien |
| BR | Brasilien | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| BY | Belarus | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CA | Kanada | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea | SG | Singapur |
| CG | Kongo | KZ | Kasachstan | SI | Slowenien |
| CH | Schweiz | LI | Liechtenstein | SK | Slowakei |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SN | Senegal |
| CM | Kamerun | LR | Liberia | SZ | Swasiland |
| CN | China | LK | Litauen | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| EE | Estland | MG | Madagaskar | UG | Uganda |
| ES | Spanien | ML | Mali | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | MN | Mongolei | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MR | Mauretanien | VN | Vietnam |
| GA | Gabon | MW | Malawi | | |

Verfahren zur Herstellung von Riboflavin mittels Mikroorganismen mit veränderter Isocitratlyase-Aktivität

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Riboflavin mittels Mikroorganismen mit veränderter Isocitratlyase-Aktivität.

10

Das Vitamin B₂, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier essentiell. Bei Vitamin-B₂-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, Risse in den Mundwinkeln, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten u.ä. Hautschäden, Bindehautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei

15 Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme eintreten. Das Vitamin B₂ hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminpräparat bei Vitaminmangel sowie als Futtermittelzusatz. Daneben wird es auch als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc., eingesetzt.

Die Herstellung von Riboflavin erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell. Bei den chemischen Herstellungsverfahren wird das
25 Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei relativ kostspielige Ausgangsprodukte - wie beispielsweise D-Ribose - eingesetzt werden müssen.

Eine Alternative zur chemischen Herstellung des Riboflavins bietet die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Als
30 Ausgangsprodukte für die mikrobielle Synthese können nachwachsende Rohstoffe, wie beispielsweise pflanzliche Öle, eingesetzt werden.

35 Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Ashbya gossypii* oder *Eremothecium ashbyii* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983); aber auch Hefen, wie z.B. *Candida* oder *Saccharomyces*, und Bakterien, wie *Clostridium*, sind zur Riboflavinproduktion geeignet. Riboflav-
40 vin-überproduzierende Bakterienstämme sind beispielsweise in der EP 405370 beschrieben, wobei die Stämme durch Transformation der Riboflavin-Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden. Diese Prokaryonten-Gene sind aber für ein rekombinantes Riboflavin-Herstellungsverfahren mit Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Ashbya gossypii* ungeeignet.
45

In WO 93/03183 ist die Klonierung der für die Riboflavin-Biosynthese spezifischen Gene aus dem eukaryontischen Organismus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Mittels dieser Gene können rekombinante eukaryontische Mikroorganismen konstruiert werden, die eine effiziente Riboflavinproduktion gestatten.

Häufig liegen jedoch die Ausgangsprodukte und Substrate der Riboflavinbiosynthese-Enzyme in dem Mikroorganismus in limitierter Menge vor, so daß trotz Erhöhung der Riboflavinbiosynthese - Aktivität keine Steigerung in der Riboflavinproduktion erreicht wird.

Es bestand daher die Aufgabe ein verbessertes mikrobielles Verfahren zur Produktion von Riboflavin bereitzustellen, das Mikroorganismen verwendet, die keine oder eine geringere Substratlimitierung besitzen und somit eine erhöhte Riboflavinproduktion erlauben.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die verwendeten Mikroorganismen eine Veränderung in ihrer endogenen Isocitratlyaseaktivität besitzen. Die Veränderung ist gegenüber dem unveränderten Ausgangsstamm zu ermitteln. Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, solche Mikroorganismen mit veränderter ICL-Aktivität zu erhalten.

Eine Möglichkeit besteht darin, das endogene ICL-Gen so zu verändern, daß es für ein Enzym mit gegenüber dem Ausgangsenzym erhöhter ICL-Aktivität codiert. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikation oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymbiosynthese reprimieren, hervorgerufen werden. Die endogene ICL-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des endogenen ICL-Gens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien oder gezielt mittels gentechnischer Methoden wie Deletionen, Insertionen oder Substitutionen.

Die ICL-Genexpression wird durch Erhöhen der ICL-Genkopienzahl und / oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die ICL-Genexpression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und Enhancer verwendet werden. Daneben ist aber auch

eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird. Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das ICL-Gen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, der vorzugsweise das dem ICL-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält, insbesondere solche, die die Genexpression verstärken. Anschließend wird ein Riboflavin-produzierenden Mikroorganismus mit dem das ICL-Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert.

- 10 Das ICL-Gen wird vorzugsweise aus Mikroorganismen, insbesondere aus dem Pilz *Ashbya gossypii*, isoliert. Für die Isolierung des Gens kommen aber auch alle weiteren Organismen, deren Zellen die anaplerotische Sequenz des Glyoxylat-Cyclus und damit die Isocitratlyase enthalten, also auch Pflanzen, in Betracht. Die Isolierung des Gens kann durch homologe oder heterologe Komplementation einer im ICL-Gen defekten Mutante oder auch durch heterologes Probing oder PCR mit heterologen Primern erfolgen. Zur Subklonierung kann das Insert des komplementierenden Plasmids anschließend durch geeignete Schnitte mit Restriktionsenzymen in der Größe minimiert werden. Nach Sequenzierung und Identifizierung des putativen Gens erfolgt eine paßgenaue Subklonierung durch Fusions-PCR. Plasmide, die die so erhaltenen Fragmente als Insert tragen, werden in die ICL-Gen-defekte Mutante eingebracht, die auf Funktionalität des ICL-Gens getestet wird. Funktionelle Konstrukte werden schließlich zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten eingesetzt.

Nach Isolierung und Sequenzierung sind Isocitratlyasegene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in SEQ ID NO:2 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren. Allelvariationen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die ICL-Aktivität aber erhalten bleibt.

- 35 Den Isocitratlyasegenen ist insbesondere ein Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 176 bis 550 gemäß SEQ ID NO:1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz vorgeschaltet. So kann beispielsweise dem Gen ein Promotor vorgeschaltet sein, der sich von dem Promotor mit der angegebenen Nukleotidsequenz durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) unterscheidet, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit des Promotors beeinträchtigt ist. Des weiteren kann der Promotor auch durch Veränderung seiner Sequenz in seiner Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht werden.

Dem ICL-Gen können des weiteren regulatorische Gensequenzen bzw. Regulatorgene zugeordnet sein, die insbesondere die ICL-Gen-Aktivität erhöhen. So können dem ICL-Gen beispielsweise sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte ICL-Genexpression bewirken.

Dem Isocitratlyasegen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Durch Klonierung des ICL-Gens sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das ICL-Gen enthalten und - wie bereits oben erwähnt - zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Ashbya gossypii* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Eine weitere Möglichkeit, Mikroorganismen mit veränderter ICL-Aktivität zu erzeugen, besteht darin, Mikroorganismen mit einer Resistenz gegenüber auf ICL hemmend wirkenden Substanzen zu erzeugen und diese zu selektionieren. Hemmstoffe der Isocitratlyase (ICL) sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Handbook of Enzyme Inhibitors, Herausgeber: Hellmut Zollner, Verlag Chemie, Weinheim, 1993, auf Seite 291 aufgeführt. Besonders geeignete Hemmstoffe sind Phosphoenolpyruvat (PEP), 6-P-Gluconat, Maleat, insbesondere aber Itaconat und Oxalat.

Werden nunmehr Riboflavin produzierende Mikroorganismen-Stämme in Gegenwart solcher Hemmstoffe kultiviert, zeigt sich überraschenderweise, daß die Riboflavinbildung gehemmt ist. Dies äußert sich auf Kulturplatten in der Ausbildung von Kolonien, die nicht gelb werden, sondern weiß bleiben. Mit diesem System sind daher Stämme leicht erkennbar, die gegen eine Isocitratlyase-Hemmung resistent sind, da solche Stämme auch in Gegenwart von Hemmstoff Riboflavin bilden und daher gelb gefärbte Kolonien ausbilden. Derartige Stämme können entweder durch Spontanmutation entstehen oder indem entsprechende Mutationen durch gängige Methoden, wie beispielsweise chemisch oder durch UV-Bestrahlung, induziert werden. Es können somit Mikroorganismen-Stämme gewonnen werden, die einen erhöhten Anteil an Riboflavin in das Kulturmedium ausscheiden. Als resistenter Stamm mit erhöhter Riboflavinbildung wurde ins-

besondere der bei der DSM unter der Nr. 10067 hinterlegte *Ashbya gossypii*-Stamm erhalten.

Als Mikroorganismus werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren
5 bevorzugt Pilze eingesetzt. Geeignete Pilze sind beispielsweise solche, die in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 aufgeführt sind.

Insbesondere sind solche der Gattungen *Pichia*, *Eremothetium* und
10 *Ashbya*, besonders *Ashbya gossypii* geeignet.

Es können aber auch andere Mikroorganismen als Pilze, beispielsweise Bakterien, insbesondere die, die in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 16, Tabelle 6 aufgeführt sind, eingesetzt werden.
15

Beispiel 1:

Erstellung einer genomischen Genbank aus *Ashbya gossypii*

20 Zur Erstellung einer genomischen DNA-Bank wurde chromosomale DNA nach der Methode von Wright und Philippsen (1991, Gene 109: 99-105) isoliert. Die DNA wurde partiell mit *Sau 3A* verdaut und mit einem Saccharose-Dichtegradienten fraktioniert. Die größten Fragmente (Figur 4) wurden mit dem *Bam HI* geschnittenen
25 *E.coli*, *S.cerevisiae* Shuttlevektor *YEp 352* (J.E. Hill et al., 1993, Yeast 2: 163-167) ligiert. Mit diesem Ligationsansatz wurde *E.coli* DH5 α transformiert. Von Platten mit Ampicillin und X-Gal wurden 3600 Kolonien isoliert, die durch ihre weiße Farbe als Klone mit Insert tragendem Plasmid erkennbar waren. Die Untersuchung von dreißig solcher zufällig ausgewählter Klone ergab, daß
30 tatsächlich alle ein Plasmid trugen, diese Inserts im Größenbereich 7-18 kb hatten und alle Inserts verschieden waren, was anhand der Restriktionsmuster erkennbar war. Aufgrund einer Genomgröße von 7×10^3 kb für *Ashbya gossypii* liegt die Wahrscheinlichkeit, das jedes Gen in dieser Genbank enthalten ist, bei 97 % -
35 99,99 %. Je 100 Klone wurden auf einer Agarplatte in großen Ausstrichen kultiviert und danach die Plasmide als Pool präpariert. Die Genbank bestand dementsprechend aus 36 Plasmidpools.

40 Beispiel 2:

Selektion des *icl1*-tragenden Genbankfragments

Mit den Plasmidpräparationen der Genbank wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* *ICL1d ura3(fs)* (E. Fernández et al., 1992, Eur. J. Biochem. 204: 983-990) transformiert. Diese Mutante ist im
45 *ICL1*-Gen disruptiert und besitzt im *ura3*-Gen eine Mutation im Leserahmen. Dieser Genotyp führt dazu, daß der Stamm nicht auf

Ethanol als Kohlenstoffquelle wachsen kann und eine Uracil-Auxotrophie zeigt. Im ersten Schritt wurden die mit der Genbank transformierten Hefezellen auf Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle selektioniert. Aufgrund des auf dem Plasmid vorhandenen *ura3*-Gens konnten nur die Zellen wachsen, die ein Plasmid aufgenommen hatten, denn das Minimalmedium enthielt kein Uracil. In diesem Schritt wurden 1900 Klone erhalten. Diese wurden durch Replikaplattierung auf ein Minimalmedium mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle übertragen. Da zum Wachstum auf Ethanol unbedingt die Isocitratlyase als anaplerotisches Enzym nötig ist, konnten nur die Klone wachsen, die auf dem Plasmid das ICL-Gen trugen. Es konnten zwei Klone isoliert werden, die auf Ethanol wuchsen.

15 Beispiel 3:

Überprüfung der Funktionalität des isolierten Genbankfragments

Zur Überprüfung, ob die Komplementierung des chromosomalen ICL-Defekts plasmid-kodiert war, wurden die selektionierten *Saccharomyces*-Klone zweimal auf Vollmedium mit Uracil kultiviert und die erhaltenen Zellen auf Platten vereinzelt. Von 16 bzw. 13 zufällig ausgewählten Klonen wuchsen 7 bzw. 5 nicht mehr auf Minimalmedium mit Glucose. Genau diese Klone wuchsen auch nicht mehr auf Minimalmedium mit Ethanol. Die Kurierung vom Plasmid war also mit dem Verlust der ICL1d-Komplementation korreliert.

Aus einem der beiden Klone wurde das Plasmid wieder isoliert. Es enthielt ein Insert von etwa 8 kb. Erneute Transformation der *Saccharomyces*. Mutante führte zur Komplementation aller gefundenen Klone. Das 8 kb - Fragment ließ sich durch *Sph* I auf 2,9 kb, die voll funktionell waren, verkürzen.

Im Rohextrakt der auf Ethanol gewachsenen Transformante war die Isocitratlyase mit einer spezifischen Aktivität von 0,3 U/mg Protein meßbar. Zudem zeigte der Westernblott mit polyklonalen Antikörpern gegen die *Ashbya*-ICL ein deutliches Signal.

PCR mit von tryptischen Peptiden der ICL abgeleiteten Primern ergab starke Signale der erwarteten Größe. Aus einem zweidimensionalen Elektrophoresegele wurde ein Protein isoliert, mit Trypsin in Peptide zerlegt und durch Edmannabbau ansequenziert. Der Vergleich der Peptidsequenzen mit Datenbanken ergab eine Identität von über 70 % mit der Isocitratlyase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Davon abgeleitete Primer wurden zur PCR eingesetzt. Von dem ca. 8 kb großen komplementierenden Genbankfragment wurden 3,3 kb sequenziert (Sanger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467). Auf der ermittelten Sequenz konnten durch

Datenbankvergleich zwei kodierende Bereiche gefunden werden. Ein Leserahmen von 1680 Basen (SEQ ID NO:1) zeigt eine 65 %ige Identität zum ICL1-Gen von *Saccharomyces cerevisiae*. Das ICL-Gen liegt 375 Basen upstream von einer Sequenz die 84 % Identität zu
5 einer Ser-tRNA von *Saccharomyces cerevisiae* zeigt (SEQ ID NO:1).

Beispiel 4:

Funktionalität subklonierter ICL in einem E.coli/Hefe/Ashbya - Shuttlevektor

10

Zwei durch Restriktionsverdau erhaltene Fragmente und ein PCR-Produkt des isolierten Genbankfragments (Figur 5) wurden in das von Steiner und Philippsen (1994, Mol. Gen. Genet 242: 263-271) konstruierte Plasmid pAG 100 (Figur 6) kloniert. Bei den Fragmenten
15 handelte es sich um ein 2.9 kb Sph I- Fragment (pAG 100 icl.4) und um ein 2.2 kb Bgl 1 / Eco RV - Fragment (pAG 100 icl.6). Beide Fragment enthielten die Ser-tRNA. Deshalb wurde zusätzlich eine PCR-Amplifikation des putativen Gens mit daran fusionierten Bam HI - Schnittstellen (pAG 100 icl.8) durchgeführt.
20 Alle drei DNAs wurden in die Bam HI site des Plasmids pAG 100 kloniert. Mit den erhaltenen Plasmiden wurde die Hefemutante *Saccharomyces cerevisiae* ICL1d ura3 (fs) transformiert. Alle drei Konstrukte führten zur vollständigen Komplementation der ICL1d-Disruption d.h. trugen funktionelle Gene.

25

Beispiel 5:

Wirkung der ICL tragenden Plasmide auf die Riboflavinbildung von *Ashbya gossypii*

30 Die Transformation von *Ashbya gossypii* (Methode: Wright und Philippsen, 1991, Gene 109: 99-105) mit den oben erklärten Plasmiden führte zu signifikanten Erhöhungen der Riboflavinbildung. Kultiviert wurde in 500 ml Schüttelkolben mit zwei Schikanen, das 50 ml Medium aus 10 g/l Sojaöl, 10 g/l Hefeextrakt und 200 µg/ml
35 Geneticin enthielt. Der Kontrollstamm A.gossypii pAG 100, der ein Plasmid ohne Insert enthielt, produzierte in zwei Tagen $18,7 \pm 0,1$ mg/l Riboflavin. Die Stämme A. gossypii pAG 100.4 und Agossypii pAG 100.6 produzierten $31,2 \pm 6,1$ mg/l bzw. $31,0 \pm 2,0$ mg/l Riboflavin (Figur 7). Eine signifikante Änderung der spezifischen
40 Aktivität der Isocitratlyase war aufgrund der starken Streuung nicht messbar. Der Stamm A. gossypii pAG 100.8 produzierte in einem Medium, das noch durch 3 g/l Glycin supplementiert wurde, innerhalb von drei Tagen $65 \pm 5,6$ mg/l Riboflavin. Der Kontrollstamm A.gossypii pAG 100 bildete dagegen im direkten Vergleich
45 nur $29,9 \pm 1,8$ mg/l Riboflavin (Figur 8). Weder in der spezifi-

schen Aktivität der Isocitratlyase noch im Myzeltrockengewicht waren signifikante Unterschiede meßbar.

Beispiel 6:

5 Reinigung einer Isocitratlyase (ICL)

Zur Identifizierung von auf ICL hemmend wirkenden Substanzen wurde zunächst die ICL aus *Ashbya gossypii* gereinigt. Die Isolierung und Reinigung des Enzyms erfolgte 10 nach Wachstum des Pilzmycels auf Pflanzenöl. Die einzelnen Reinigungsschritte sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt: Demgemäß enthält ein typischer, aus ca. 25 g Mycel hergestellter Rohextrakt, der durch Zellaufschluß mit einer French-Press gewonnen wurde, 220 Einheiten ICL-Aktivität. Etwa 78% davon sind nach Zentrifugation bei 40.000 g 15 gelöst im Überstand wiederzufinden. Eine anschließende fraktionierte Ammoniumsulfatfällung führt zu einer dreifachen Anreicherung des Enzyms. Nach einer Gelfiltration mit einer Sephacryl S-300 Säule wird die ICL an den Kationenaustauscher Mono S-Sepharose gebunden und mit NaCl eluiert. Das so erhaltene Präparat ist 20 homogen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und hat eine spezifische Aktivität von 18,4 U/mg.

Beispiel 7:

Identifizierung von ICL-Hemmstoffen

25

Mit dem gereinigten Enzym lassen sich in einem colorimetrischen Test (Dixon, H. und Kornberg, H.L. (1959), Biochem. J. 72, 3: Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle) Einflüsse von Substanzen auf die Aktivität messen. In Tabelle 2 und Figur 1 30 sind die Effekte der getesteten Substanzen auf das Enzym zusammengefaßt bzw. dargestellt. Untersucht wurden zum einen Substanzen, die als Metaboliten in der Pilzzelle einen hemmenden Effekt auf das Enzym haben könnten. Darunter zeigten 6-P-Gluconat und Phosphoenolpyruvat die deutlichsten Hemmwirkungen mit über 35 50% bei einer Konzentration von 10 mM. Erheblich besser wirkten jedoch Itakonat und Oxalat, die vermutlich nicht im Stoffwechsel des Pilzes vorkommen. Bereits eine Konzentration von 1 mmol führte zu 78% bzw. 95% Hemmung.

40 Beispiel 8:

Charakterisierung einer mit Itakonat selektierten Mutante

Durch UV-Bestrahlung von isolierten Sporen des Pilzes lassen sich Mutationen im Erbmateriel erzeugen. Mit einer Strahlendosis, bei 45 der 10-20% der eingesetzten Sporen überleben, erhält man Mutanten, die gegen eine Hemmung der Riboflavinbildung durch Itakonat resistent sind. Eine so isolierte Mutante zeigt bei Wachstum auf

Sojaöl eine 25-fache Riboflavinbildung im Vergleich zum Ausgangsstamm (Figur 2). Die spezifische ICL-Aktivität ist während der Riboflavinbildungsphase um bis zu 15% erhöht (Figur 2). Mit Antikörpern läßt sich zeigen, daß die Proteinmenge erhöht ist. Die ICL aus der Mutante zeigt das gleiche Hemmverhalten durch Itakonatin wie der Ausgangsstamm.

Beispiel 9:

Korrelation von Riboflavinbildung und spezifischer ICL-Aktivität

10

Einen überraschenden Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen ICL und Riboflavinbildung liefert die Beobachtung, daß der Pilz, wenn Glucose als Substrat angeboten wird, erst nach Verbrauch der Glucose mit der Produktion beginnt. Genau dann wird auch die ICL, die zuvor durch Glucose reprimiert ist, im Rohextrakt meßbar und steigt bis zu Aktivitäten, wie sie bei Wachstum auf Öl gefunden werden, an (Figur 3).

20

25

30

35

40

45

10
SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056
- (G) TELEPHON: 0621/6048526
- (H) TELEFAX: 0621/6043123
- (I) TELEX: 1762175170

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Leo-Brandt-Strasse
- (C) ORT: Juelich
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-52425
- (G) TELEPHON: 02461-61 3004

- (ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung von Riboflavin
mittels Mikroorganismen mit veraenderter Isocitratlyase
Aktivitaet

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2364 Basenpaare
- (B) ART: Nukleins"ure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÄLS: cDNS zu mRNS

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

- (iii) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..550

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 551..2233

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 2234..2364

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | |
|---|-----|
| CGAAAGCGCC AAATACCGGA AACGGCACAG GCGCAGCTCT AATAGCCGTT CCACGATAAC | 60 |
| TTTGGAAGTT ATGGCACTAT GGCCGAGTGG TTAAGGCGAC AGACTTGAAA TCTGTTGGGC | 120 |
| TCTGCCCCGCG CTGGTTCAAA TCCTGCTGGT GTCGTTATTT TTGCCGTTTC TTTTATAGATG | 180 |
| AAACTCAGGG GCCTTTAGTC CGCCCTTTTG CCCGCTGATT CATCGCCCGC CAGCAACACC | 240 |
| GGTTGAGCCG ATCAGCGCAA GAACGCGCAA AGTCACGTAT GGCCCCTAAG AGTTGAGCTC | 300 |
| TCCCCCTCGG CTCCTTCCGG GCGCGGAAAA GCCTGCGTCA CCCCATTAAG TCCGAAACCG | 360 |
| CGTTCAAGTG TACTTGGTCC GGGCCAATGT GGTTGCCTCA TCCGAGTCAC CGATACGCAG | 420 |
| GTGCGCCCGT CGAGTCACCA TTAGGAGTAG AGCATCTGAT TATATATAGG CCTAGTTACA | 480 |
| GCGGTAACAT AGACTGATAG CTCCAGCTCC AGCACTAGCT TGTAGGACAT CTGCGCGACA | 540 |
| CCCAGTGAAC ATG TCC CCT TCC GTC AGA GAC GCC CGC AAC GAC CTT GCC | 589 |
| Met Ser Pro Ser Val Arg Asp Ala Arg Asn Asp Leu Ala | |
| 1 5 10 | |
| AGC CTG CAA CAG CAG GCA GCC GCC GAA GCC GAG GAT ATT AGG AGA TGG | 637 |
| Ser Leu Gln Gln Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Asp Ile Arg Arg Trp | |
| 15 20 25 | |
| TGG AGC CAG CCA CGG TGG GCG GGC ACC AAG CGC GTG TAC ACG GCC GAG | 685 |
| Trp Ser Gln Pro Arg Trp Ala Gly Thr Lys Arg Val Tyr Thr Ala Glu | |
| 30 35 40 45 | |
| GAC ATC GTC AAG CGC CGC GGC ACG TTC CCT GTC GTC GAA TAC CCA TCT | 733 |
| Asp Ile Val Lys Arg Arg Gly Thr Phe Pro Val Val Glu Tyr Pro Ser | |
| 50 55 60 | |
| TCC GTA ATG GCG GAC AAG CTC GTG GAG ACA TTG GCG CGG CAC TCG CGC | 781 |
| Ser Val Met Ala Asp Lys Leu Val Glu Thr Leu Ala Arg His Ser Arg | |
| 65 70 75 | |
| AAC GGC ACG GTT TCA CAG ACG TTC GGA GTG CTC GAC CCA GTG CAA ATG | 829 |
| Asn Gly Thr Val Ser Gln Thr Phe Gly Val Leu Asp Pro Val Gln Met | |
| 80 85 90 | |
| ACG CAA ATG GTG AAG TAT CTG GAC ACG ATT TAC GTG TCT GGC TGG CAA | 877 |
| Thr Gln Met Val Lys Tyr Leu Asp Thr Ile Tyr Val Ser Gly Trp Gln | |
| 95 100 105 | |
| TGC AGC GCC ACG GCT TCG ACC TCG AAC GAG CCT GGG CCC GAT CTC GCG | 925 |
| Cys Ser Ala Thr Ala Ser Thr Ser Asn Glu Pro Gly Pro Asp Leu Ala | |
| 110 115 120 125 | |
| GAC TAT CCG ATG GAC ACC GTG CCA AAC AAG GTC GAG CAC CTG TTC ATG | 973 |
| Asp Tyr Pro Met Asp Thr Val Pro Asn Lys Val Glu His Leu Phe Met | |

| 130 | 135 | 140 | |
|---|-----|-----|------|
| GCG CAG CTG TTC CAC GAC CGG AAA CAG CGC GAG GCC CGC CTG TCG TGC Ala Gln Leu Phe His Asp Arg Lys Gln Arg Glu Ala Arg Leu Ser Cys 145 150 155 | | | 1021 |
| ACT ACC CAG CGC GAG CTC GAC CAA TTG GGG CCT GAG ATT GAC TAC TTG Thr Thr Gln Arg Glu Leu Asp Gln Leu Gly Pro Glu Ile Asp Tyr Leu 160 165 170 | | | 1069 |
| AGG CCG ATT GTC GCT GAC GCA GAC ACC GGC CAC GGC GGG CTA ACA GCC Arg Pro Ile Val Ala Asp Ala Asp Thr Gly His Gly Gly Leu Thr Ala 175 180 185 | | | 1117 |
| GTC TTT AAA CTC ACG AAG ATG TTC ATC GAG CGC GGT GCA GCC GGT ATC Val Phe Lys Leu Thr Lys Met Phe Ile Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile 190 195 200 205 | | | 1165 |
| CAC ATG GAG GAC CAG TCC TCC AGC AAC AAA AAG TGC GGC CAC ATG GCG His Met Glu Asp Gln Ser Ser Ser Asn Lys Lys Cys Gly His Met Ala 210 215 220 | | | 1213 |
| GGC CGC TGC GTG ATC CCT GTT CAG GAG CAC ATT AGT CGT TTA GTG ACT Gly Arg Cys Val Ile Pro Val Gln Glu His Ile Ser Arg Leu Val Thr 225 230 235 | | | 1261 |
| GTG CGC ATG TGT GCG GAC GTG ATG CAC TCG AAC CTG GTG CTT GTC GCG Val Arg Met Cys Ala Asp Val Met His Ser Asn Leu Val Leu Val Ala 240 245 250 | | | 1309 |
| AGA ACA GAC TCG GAG GCC GCC ACC TTA CTT AGC TCG AAC ATT GAC GCG Arg Thr Asp Ser Glu Ala Ala Thr Leu Leu Ser Ser Asn Ile Asp Ala 255 260 265 | | | 1357 |
| CGC GAT CAT TAC TAC ATT GTC GGG GCC TCG AAC CCT GAG GTA ACT GTA Arg Asp His Tyr Tyr Ile Val Gly Ala Ser Asn Pro Glu Val Thr Val 270 275 280 285 | | | 1405 |
| CCG CTG ATC GAA GTT TTG GAC GCC GCG CAG CAG GCC GGC GCC TCA GGT Pro Leu Ile Glu Val Leu Asp Ala Ala Gln Gln Ala Gly Ala Ser Gly 290 295 300 | | | 1453 |
| GAC AGA TTG GCT CAG CTA GAG GAG GAC TGG TGC AAG AAG GCC AAG TTG Asp Arg Leu Ala Gln Leu Glu Glu Asp Trp Cys Lys Lys Ala Lys Leu 305 310 315 | | | 1501 |
| AGG CTC TTC CAC GAG GCA TTT GCC GAC CAG GTG AAT GCC AGC CCT TCG Arg Leu Phe His Glu Ala Phe Ala Asp Gln Val Asn Ala Ser Pro Ser 320 325 330 | | | 1549 |
| ATC AAA GAC AAG GCG GGC GTT ATT GCC AAA TTT AAC TCA CAG ATC GGG Ile Lys Asp Lys Ala Gly Val Ile Ala Lys Phe Asn Ser Gln Ile Gly 335 340 345 | | | 1597 |
| CCA CAG ACA GGC GCG TCG ATC AGA GAG ATG CGC AAA CTG GGC CGC GAG Pro Gln Thr Gly Ala Ser Ile Arg Glu Met Arg Lys Leu Gly Arg Glu 350 355 360 365 | | | 1645 |

13

| | |
|---|------|
| CTG CTC GGG CAG GAC GTC TAC TTC GAC TGG GAC CTG CCT CGC GCT AGA Leu Leu Gly Gln Asp Val Tyr Phe Asp Trp Asp Leu Pro Arg Ala Arg 370 375 380 | 1693 |
| GAG GGC TTG TAC CGC TAC AAG GGC GGC ACC CAG TGC GCG ATC ATG CGC Glu Gly Leu Tyr Arg Tyr Lys Gly Gly Thr Gln Cys Ala Ile Met Arg 385 390 395 | 1741 |
| GCA CGC GCG TTC GCG CCG TAC GCC GAC CTG GTC TGG TTC GAA TCC AAC Ala Arg Ala Phe Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Val Trp Phe Glu Ser Asn 400 405 410 | 1789 |
| TTC CCT GAC TTC CAG CAG GCT AAG GAG TTT GCG CAG GGC GTG CGC GAG Phe Pro Asp Phe Gln Gln Ala Lys Glu Phe Ala Gln Gly Val Arg Glu 415 420 425 | 1837 |
| AAG TTC CCC AAC AAG TGG ATG GCC TAC AAC TTG TCG CCC AGC TTC AAC Lys Phe Pro Asn Lys Trp Met Ala Tyr Asn Leu Ser Pro Ser Phe Asn 430 435 440 445 | 1885 |
| TGG CCG AAG GCC ATG CCT CCC AAG GAG CAG GAG AAC TAC ATC CAA CGG Trp Pro Lys Ala Met Pro Pro Lys Glu Gln Glu Asn Tyr Ile Gln Arg 450 455 460 | 1933 |
| CTG GGC GAG ATC GGA TAT GTG TGG CAG TTC ATC ACG CTA GCC GGC CTG Leu Gly Glu Ile Gly Tyr Val Trp Gln Phe Ile Thr Leu Ala Gly Leu 465 470 475 | 1981 |
| CAT ACC AAT GCC TTG GCC ATC GAC AAC TTC TCG CGC GAA TTC AGC AGG His Thr Asn Ala Leu Ala Ile Asp Asn Phe Ser Arg Glu Phe Ser Arg 480 485 490 | 2029 |
| TTC GGA ATG CGT GCG TAT GCA CAA GGC ATC CAG CAG AGG GAG ATG GAC Phe Gly Met Arg Ala Tyr Ala Gln Gly Ile Gln Gln Arg Glu Met Asp 495 500 505 | 2077 |
| GAG GGC GTC GAT GTC CTA AAA CAC CAG AAG TGG GCC GGC GCA GAG TAT Glu Gly Val Asp Val Leu Lys His Gln Lys Trp Ala Gly Ala Glu Tyr 510 515 520 525 | 2125 |
| GTT GAC AGC ATT CTC AAG CTT GCC CAG GGC GGT GTG TCT TCG ACA GCC Val Asp Ser Ile Leu Lys Leu Ala Gln Gly Gly Val Ser Ser Thr Ala 530 535 540 | 2173 |
| TCG ATG GGT AAG GGT GTA ACC GAA GAG CAG TTC GGC TCC TCA AAC GGT Ser Met Gly Lys Gly Val Thr Glu Glu Gln Phe Gly Ser Ser Asn Gly 545 550 555 | 2221 |
| GCC AAA CTA TGATATCATC TCTGAGTCAT TTCTCTCGAC AAGATCCTCG Ala Lys Leu 560 | 2270 |
| GCCAGACTTC TGGAATATAT ATAACATCGG GTACCCCGAC ATCCCTGCCT TCCGCAACGT | 2330 |
| GCGAAGCAGC TGATACGTAT ACTTTAAACG CACA | 2364 |

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

14

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 560 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) 'ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Met Ser Pro Ser Val Arg Asp Ala Arg Asn Asp Leu Ala Ser Leu Gln
 1             5             10             15
Gln Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Asp Ile Arg Arg Trp Trp Ser Gln
          20             25             30
Pro Arg Trp Ala Gly Thr Lys Arg Val Tyr Thr Ala Glu Asp Ile Val
      35             40             45
Lys Arg Arg Gly Thr Phe Pro Val Val Glu Tyr Pro Ser Ser Val Met
      50             55             60
Ala Asp Lys Leu Val Glu Thr Leu Ala Arg His Ser Arg Asn Gly Thr
      65             70             75             80
Val Ser Gln Thr Phe Gly Val Leu Asp Pro Val Gln Met Thr Gln Met
          85             90             95
Val Lys Tyr Leu Asp Thr Ile Tyr Val Ser Gly Trp Gln Cys Ser Ala
          100             105             110
Thr Ala Ser Thr Ser Asn Glu Pro Gly Pro Asp Leu Ala Asp Tyr Pro
          115             120             125
Met Asp Thr Val Pro Asn Lys Val Glu His Leu Phe Met Ala Gln Leu
          130             135             140
Phe His Asp Arg Lys Gln Arg Glu Ala Arg Leu Ser Cys Thr Thr Gln
          145             150             155             160
Arg Glu Leu Asp Gln Leu Gly Pro Glu Ile Asp Tyr Leu Arg Pro Ile
          165             170             175
Val Ala Asp Ala Asp Thr Gly His Gly Gly Leu Thr Ala Val Phe Lys
          180             185             190
Leu Thr Lys Met Phe Ile Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile His Met Glu
          195             200             205
Asp Gln Ser Ser Ser Asn Lys Lys Cys Gly His Met Ala Gly Arg Cys
          210             215             220
Val Ile Pro Val Gln Glu His Ile Ser Arg Leu Val Thr Val Arg Met
          225             230             235             240
Cys Ala Asp Val Met His Ser Asn Leu Val Leu Val Ala Arg Thr Asp
          245             250             255
Ser Glu Ala Ala Thr Leu Leu Ser Ser Asn Ile Asp Ala Arg Asp His
          260             265             270

```

15

Tyr Tyr Ile Val Gly Ala Ser Asn Pro Glu Val Thr Val Pro Leu Ile
 275 280 285
 Glu Val Leu Asp Ala Ala Gln Gln Ala Gly Ala Ser Gly Asp Arg Leu
 290 295 300
 Ala Gln Leu Glu Glu Asp Trp Cys Lys Lys Ala Lys Leu Arg Leu Phe
 305 310 315 320
 His Glu Ala Phe Ala Asp Gln Val Asn Ala Ser Pro Ser Ile Lys Asp
 325 330 335
 Lys Ala Gly Val Ile Ala Lys Phe Asn Ser Gln Ile Gly Pro Gln Thr
 340 345 350
 Gly Ala Ser Ile Arg Glu Met Arg Lys Leu Gly Arg Glu Leu Leu Gly
 355 360 365
 Gln Asp Val Tyr Phe Asp Trp Asp Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gly Leu
 370 375 380
 Tyr Arg Tyr Lys Gly Gly Thr Gln Cys Ala Ile Met Arg Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 Phe Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Val Trp Phe Glu Ser Asn Phe Pro Asp
 405 410 415
 Phe Gln Gln Ala Lys Glu Phe Ala Gln Gly Val Arg Glu Lys Phe Pro
 420 425 430
 Asn Lys Trp Met Ala Tyr Asn Leu Ser Pro Ser Phe Asn Trp Pro Lys
 435 440 445
 Ala Met Pro Pro Lys Glu Gln Glu Asn Tyr Ile Gln Arg Leu Gly Glu
 450 455 460
 Ile Gly Tyr Val Trp Gln Phe Ile Thr Leu Ala Gly Leu His Thr Asn
 465 470 475 480
 Ala Leu Ala Ile Asp Asn Phe Ser Arg Glu Phe Ser Arg Phe Gly Met
 485 490 495
 Arg Ala Tyr Ala Gln Gly Ile Gln Gln Arg Glu Met Asp Glu Gly Val
 500 505 510
 Asp Val Leu Lys His Gln Lys Trp Ala Gly Ala Glu Tyr Val Asp Ser
 515 520 525
 Ile Leu Lys Leu Ala Gln Gly Gly Val Ser Ser Thr Ala Ser Met Gly
 530 535 540
 Lys Gly Val Thr Glu Glu Gln Phe Gly Ser Ser Asn Gly Ala Lys Leu
 545 550 555 560

Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin durch
5 Kultivierung von Riboflavin produzierenden Mikroorganismen in einem Nährmedium und anschließender Isolierung des hergestellten Riboflavins, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen verwendet werden, bei denen die endogene Isocitrat-lyase (ICL) Aktivität verändert wurde.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen durch Mutation des endogenen ICL-Gens ein Enzym mit höherer ICL-Aktivität aufweisen.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen durch eine Erhöhung der ICL-Genkopienzahl eine höhere ICL-Genexpression besitzen.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das ICL-Gen mit regulatorischen DNA-Sequenzen funktionell verknüpft wurde, die eine verstärkte Genexpression des ICL-Gens erlauben.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen mit Resistenz gegenüber auf ICL hemmend wirkenden Substanzen verwendet werden.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen resistent gegenüber den Stoffen Itakonat oder Oxalat sind.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismus ein Pilz verwendet wird.
- 35 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Pilz aus der Gattung Ashbya verwendet wird.
9. ICL-Gen codierend für die in SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 40 10. Genkonstrukt enthaltend ein ICL-Gen gemäß Anspruch 9.
- 45 11. Genkonstrukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das ICL-Gen funktionell mit einem oder mehreren Regulations-signalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurde.

1/10

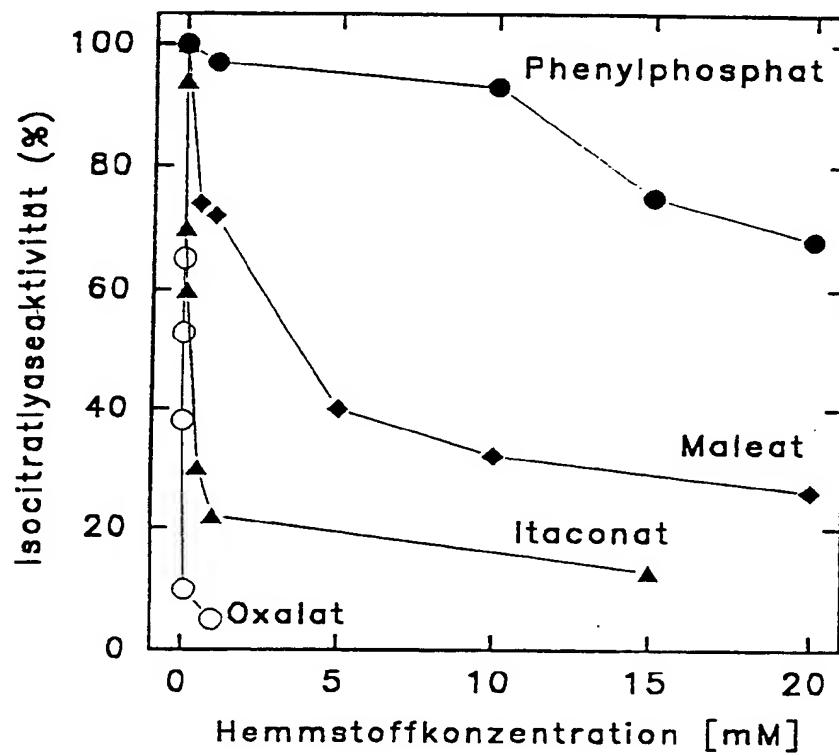
| Fraktion | Gesamtaktivität (Units) | Gesamtprotein (mg) | spez. Aktivität (U/mg protein) | Reinigungsfaktor (-fach) | Ausbeute (%) |
|---|----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| Rohextrakt | 220 | 1310 | 0.17 | 1.0 | 100 |
| 40,000 g Überstand | 170 | 730 | 0.23 | 1.3 | 78 |
| 35% (NH ₄) ₂ SO ₄ Überstand | 160 | 630 | 0.25 | 1.5 | 72 |
| 60% (NH ₄) ₂ SO ₄ Pellet | 160 | 300 | 0.53 | 3.1 | 72 |
| Sephacryl S-300 Eluat | 52 | 5 | 10.8 | 63 | 23 |
| Mono S Eluat | 35 | 0.5 | 18.4 | 108 | 16 |

Tabelle 1.

| Hemmstoff | Konzentration (mM) | Hemmung (%) | Hemmtyp |
|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------------------|
| Glucose-6-P | 10 | <5 | |
| Citrat | 10 | 22 | |
| Fumarat | 10 | 25 | |
| Succinat | 10 | 34 | noncompetitive; K_i :15.8 mM |
| Malat | 10 | 36 | |
| PEP | 10 | 55 | hyperbolic mixed-type |
| 6-P-Gluconat | 10 | 60 | |
| Glycin | 10 | <5 | |
| Aspartat | 10 | 13 | |
| Glutamat | 10 | 15 | |
| Phenylphosphat | 10 | 7 | |
| Maleat | 10 | 68 | |
| Itaconat | 1 | 78 | linear mixed-type; K_i :0.17 mM |
| Oxalat | 1 | 95 | noncompetitive; K_i :0.004 mM |

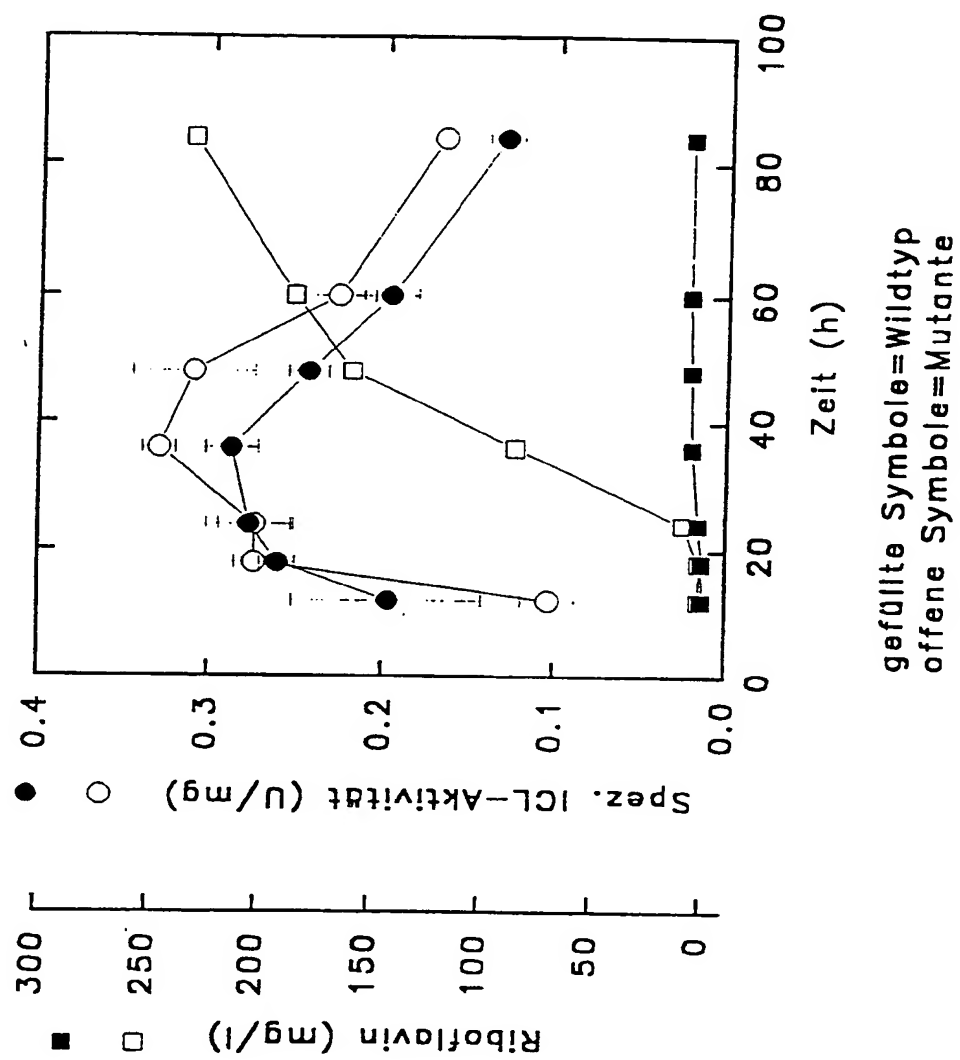
Tabelle 2.

3/10



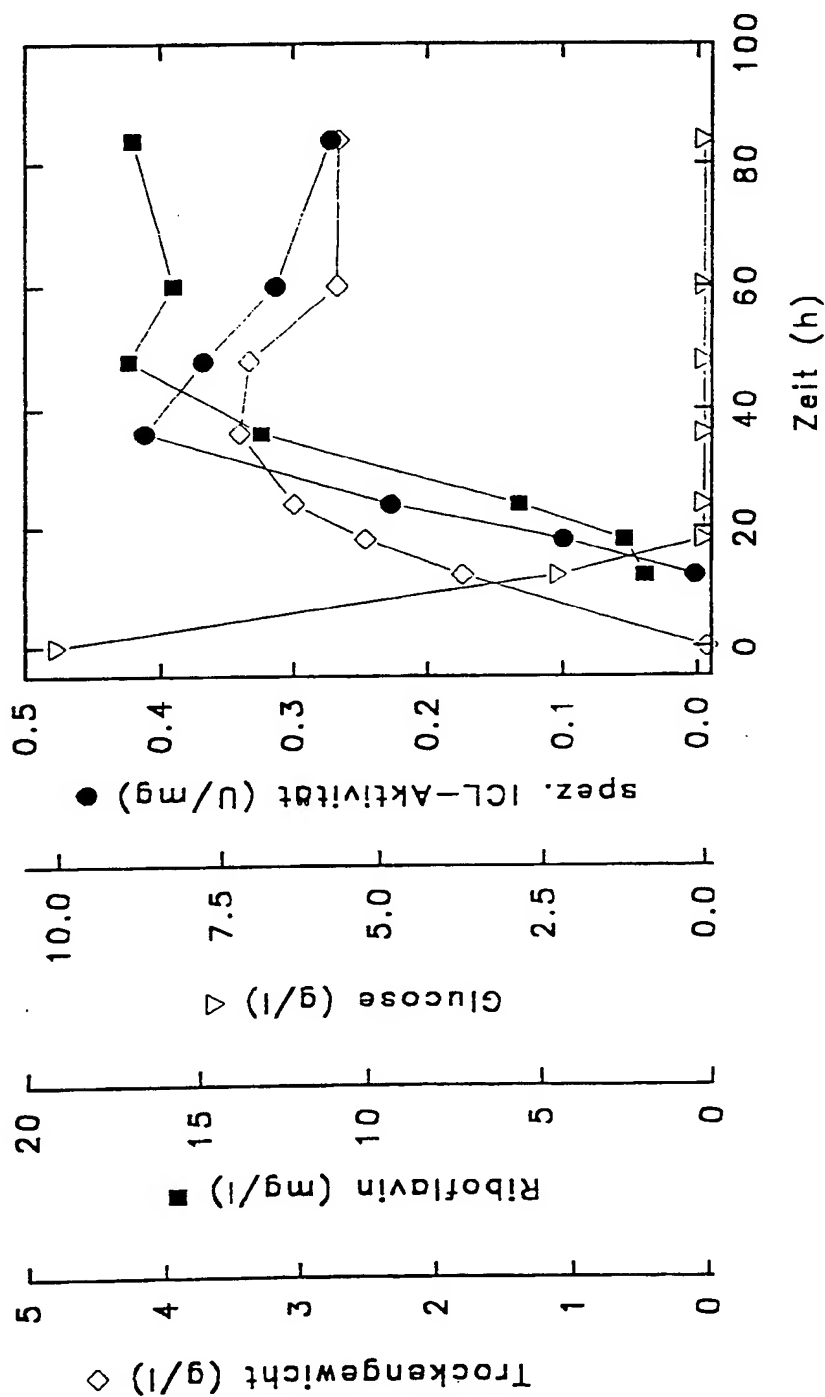
Figur 1

4/10



Figur 2

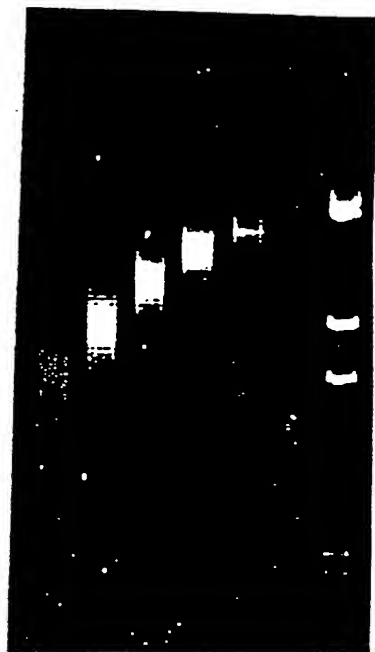
5/10



Figur 3

6/10

Standards



23,1 kb

9,4 kb

6,5 kb

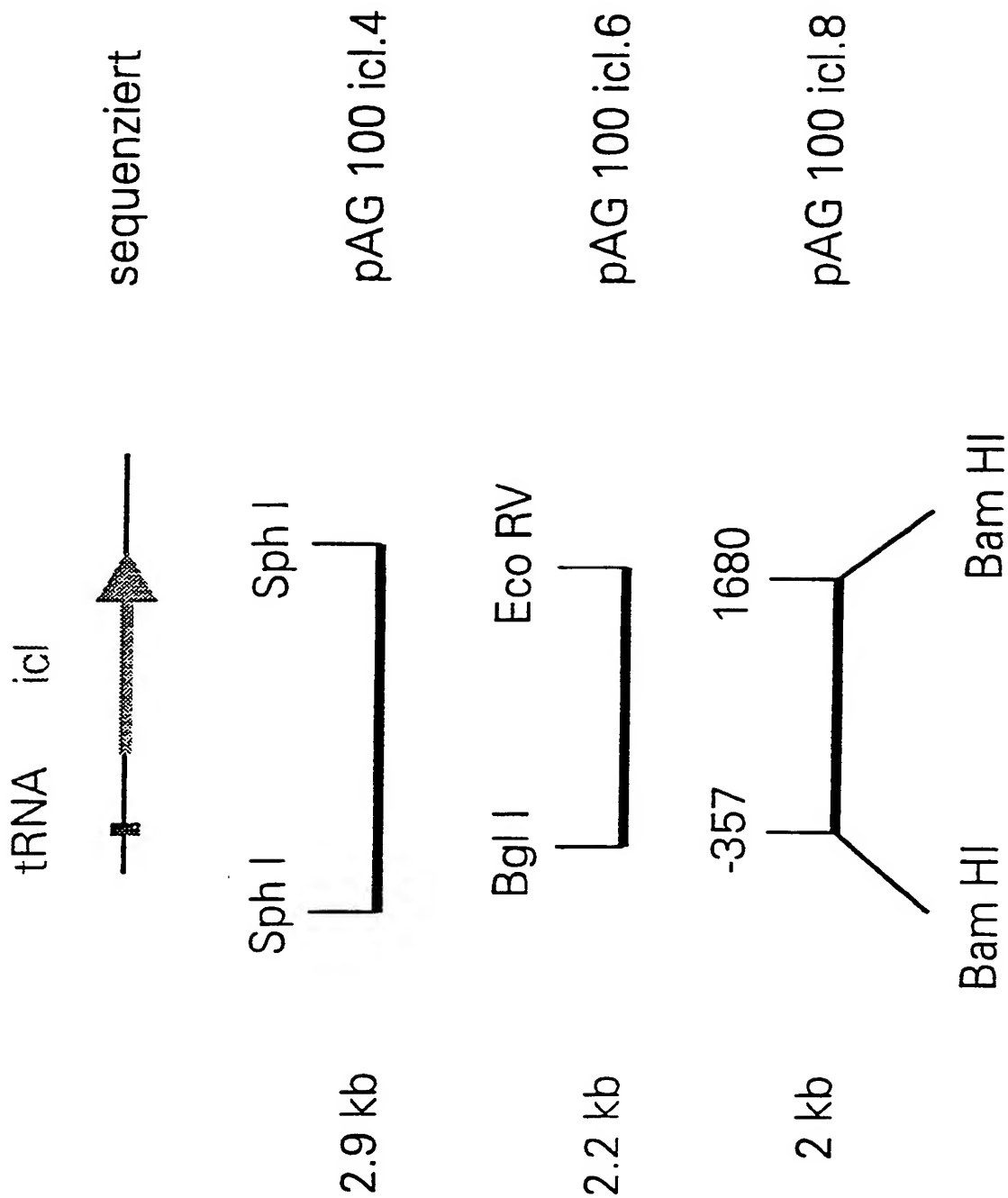
2,3 kb



Fraktionen des Sau 3A - Verdaus
nach Ultrazentrifugation

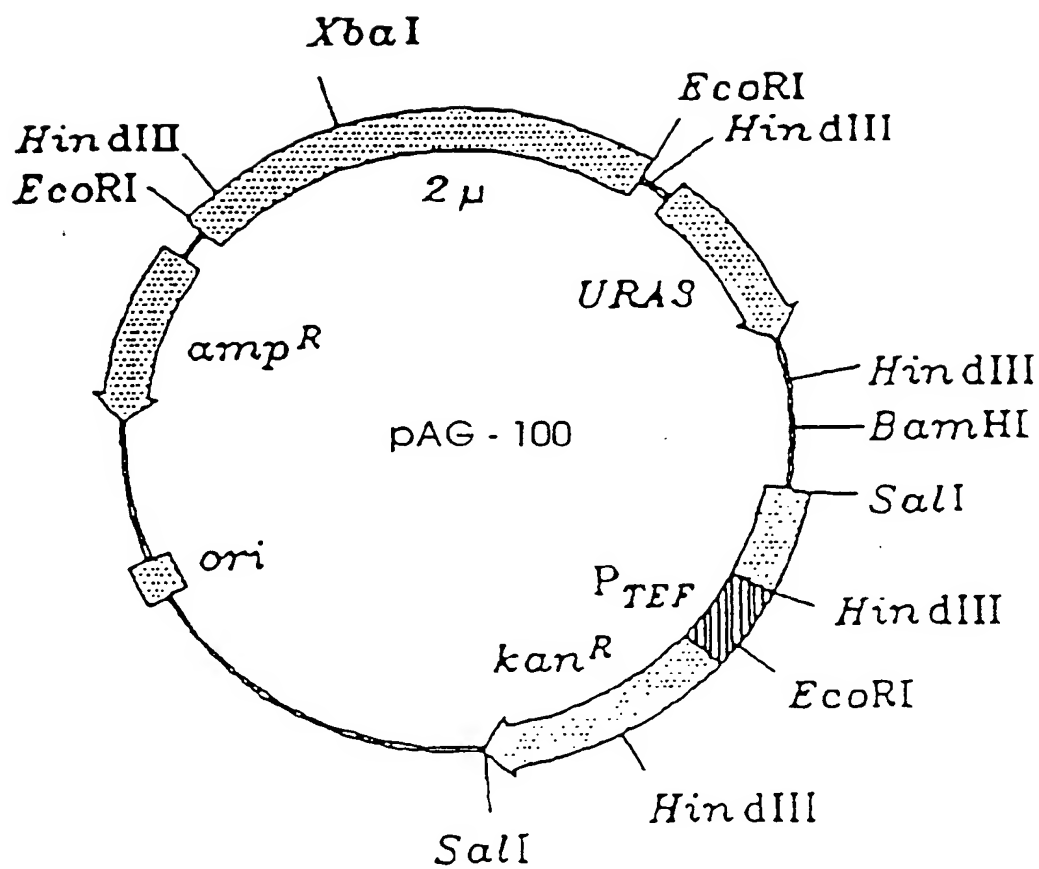
Figur 4

7/10



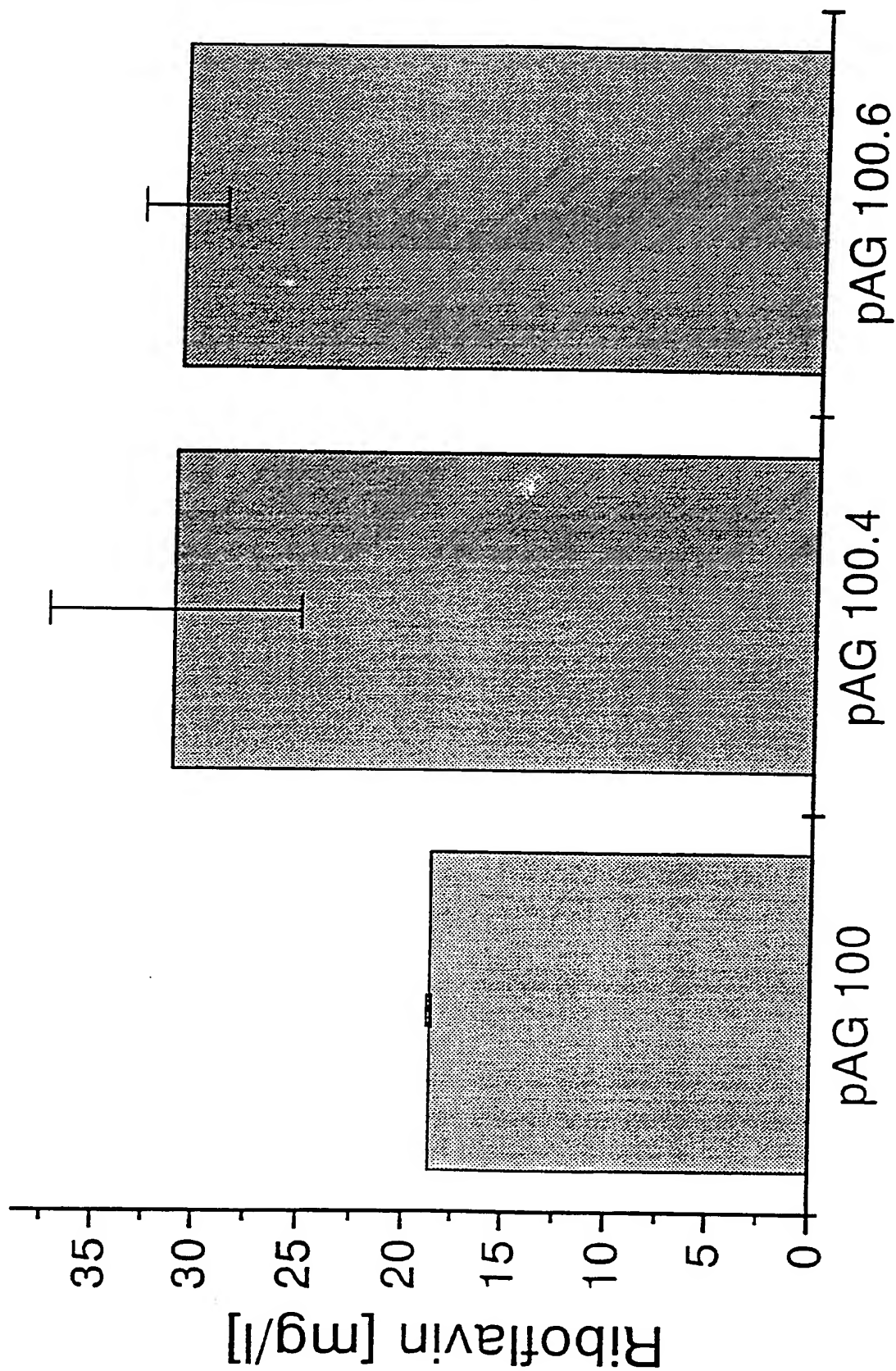
Figur 5

8/10



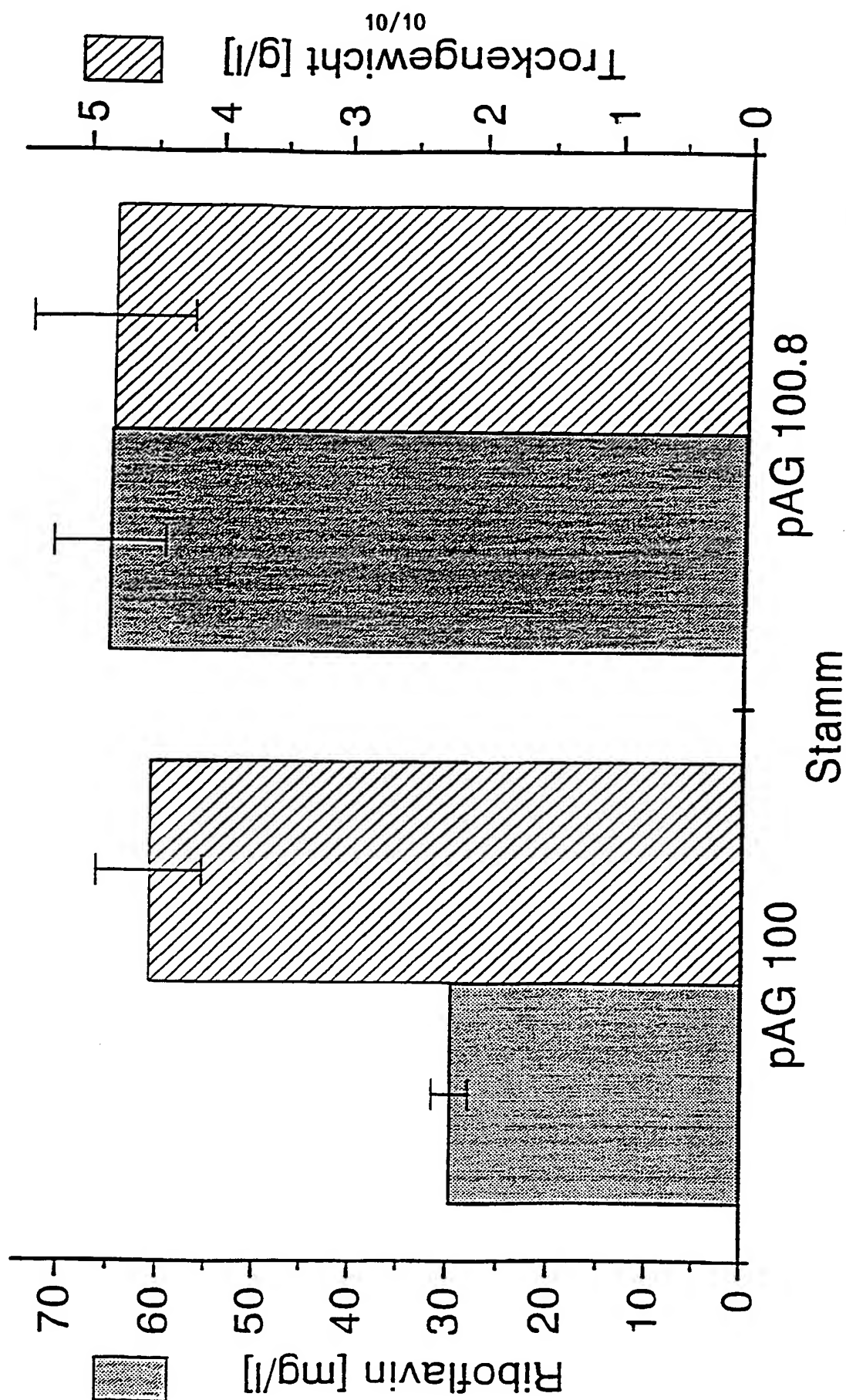
Figur 6

9/10



Stamm

Figur 7



Figur 8

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 927 761 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
07.07.1999 Patentblatt 1999/27

(21) Anmeldenummer: 98123331.5

(22) Anmeldetag: 08.12.1998

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/52**, C12N 15/53,
C12N 15/54, C12P 25/00,
C12N 9/00, C12N 9/04,
C12N 9/10, C12N 9/12

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 23.12.1997 DE 19757755

(71) Anmelder:
BASF AKTIENGESELLSCHAFT
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:

- Pompejus, Markus Dr.
67165 Waldsee (DE)
- Seulberger, Harald Dr.
67141 Neuhofen (DE)
- Höffken, Hans Wolfgang Dr.
67069 Ludwigshafen (DE)
- Revuelta Doval, Jose Luis Prof.-Dr.
37001 Salamanca (ES)
- Jimenez, Alberto
37006 Salamanca (ES)
- Santos Garcia, Maria Angeles Dr.
37009 Salamanca (ES)

(54) **Gene der Purinbiosynthese aus *Ashbya gossypii* und deren Verwendung in der mikrobiellen Riboflavinsynthese**

(57) Gene der Purinbiosynthese aus *Ashbya gossypii* und deren Verwendung in der mikrobiellen Riboflavinsynthese.

EP 0 927 761 A2

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Gene der Purinbiosynthese aus *Ashbya gossypii* und deren Verwendung in der Riboflavinsynthese.

[0002] Vitamin B2, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier essentiell. Bei Vitamin B2-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten und ähnliche Hautschäden, Bindehautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme eintreten. Vitamin B2 hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminzusatz bei Vitaminmangel und als Futtermittelzusatz. Daneben wird es als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc. eingesetzt.

[0003] Die Herstellung von Vitamin B2 erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell (siehe z.B. Kurth et al. (1996) Riboflavin, in: Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry, VCH Weinheim). Bei den chemischen Herstellungsverfahren wird Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei relativ kostspielige Ausgangsprodukte, wie z.B. D-Ribose, eingesetzt werden müssen. Eine Alternative zur chemischen Synthese von Riboflavin ist die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Als Ausgangsstoffe dienen dabei nachwachsende Rohstoffe, wie Zucker oder pflanzliche Öle. Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Eremothecium ashbyii* oder *Ashbya gossypii* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983), aber auch Hefen, wie z.B. *Candida*, *Pichia* und *Saccharomyces* oder Bakterien, wie z.B. *Bacillus*, Clostridien oder Corynebakterien sind als Riboflavin-Produzenten beschrieben.

[0004] In der EP 405370 sind Riboflavin-überproduzierende Bakterienstämme beschrieben, die durch Transformation der Riboflavin-Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden. Diese dort beschriebenen Gene und andere, an der Vitamin B2-Biosynthese beteiligten Gene aus Prokaryonten sind für ein rekombinantes Riboflavin-Herstellungsverfahren mit Eukaryonten, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* oder *Ashbya gossypii* ungeeignet.

[0005] In der DE 44 20 785 sind sechs Riboflavin-Biosynthesegene aus *Ashbya gossypii* beschrieben, sowie Mikroorganismen, die mit diesen Genen transformiert wurden und die Verwendung solcher Mikroorganismen zur Riboflavinsynthese.

[0006] Mit diesen Verfahren ist es möglich, Produktionsstämme für die mikrobielle Riboflavinsynthese zu erzeugen. Diese Produktionsstämme besitzen jedoch häufig Stoffwechsellimitierungen, die durch die insertierten Biosynthesegene nicht beseitigt werden können oder manchmal erst dadurch entstehen. Solche Produktionsstämmen können manchmal nicht genügend Substrat zur Sättigung mancher Biosyntheseschritte liefern, so daß die Biosynthesekapazität mancher Stoffwechselabschnitte gar nicht voll ausgeschöpft werden kann.

[0007] Daher ist es wünschenswert, weitere Teilbereiche von Stoffwechselwegen zu verstärken, dadurch Stoffwechselengpässe zu beseitigen und dadurch dann die für die mikrobielle Riboflavinsynthese eingesetzten Mikroorganismen (Produktionsstämme) bezüglich ihrer Fähigkeit zur Riboflavinsynthese weiter zu optimieren. Es ist anzustreben, die zu verstärkenden Teilbereiche des komplexen Stoffwechsels zu identifizieren und diese auf geeignete Weise zu verstärken.

[0008] Die Erfindung betrifft neue Proteine der Purinbiosynthese, deren Gene und deren Verwendung für die mikrobielle Riboflavinsynthese.

[0009] Der Purinstoffwechsel (für eine Übersicht siehe z.B. Voet, D. und Voet, J.G., 1994, Biochemie, VCH Weinheim, Seite 743-771; Zalkin, H. und Dixon, J.E., 1992, De novo purine nucleotide biosynthesis, in: Progress in nucleic acid research and molecular biology, Vol. 42, Seite 259-287, Academic Press) ist ein für alle Lebewesen essentieller Teil des Stoffwechsels. Fehlerhafter Purinstoffwechsel kann beim Menschen zu schweren Krankheiten führen (z.B. Gicht). Der Purinstoffwechsel ist zudem ein wichtiges Target für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Zahllose Publikationen sind erschienen, die Substanzen für diese Indikationen beschreiben die im Purinstoffwechsel eingreifen (als Übersicht z.B. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D., 1990, Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents, Med. Res. Reviews 10, Seite 505-548).

[0010] Untersuchungen der in Purinstoffwechsel beteiligten Enzyme (Smith, J.L., Enzymes in nucleotide synthesis, 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 752-757) zielen darauf ab, neue immunsuppressiv, anti-parasitär oder anti-proliferierend wirkende Medikamente zu entwickeln (Biochem. Soc. Transact. 23, Seite 877-902, 1995).

[0011] Bei diesen Medikamenten handelt es sich dann üblicherweise um natürlich nicht vorkommende Purine, Pyrimidine oder davon abgeleiteter Verbindungen.

[0012] Gegenstand der Erfindung ist ein Protein mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO:2 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 15% der Aminosäuren erhältlichen Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer Phosphoribosylpyrophosphat-Synthetase.

[0013] Die in SEQ ID NO:2 dargestellte Sequenz ist das aus *Ashbya gossypii* erhaltene Genprodukt des KPR1 Gens (SEQ ID NO:1).

[0014] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein mit der in SEQ ID NO:5 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO:5 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 10% der Aminosäuren erhältlichen

Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase.

[0015] Die in SEQ ID NO:5 dargestellte Sequenz ist das aus *Ashbya gossypii* erhaltene Genprodukt des ADE4 Gens (SEQ ID NO:3).

[0016] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein mit der in SEQ ID NO:8 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO:8 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 20% der Aminosäuren erhältlichen Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer IMP-Dehydrogenase.

[0017] Die in SEQ ID NO:8 und 9 dargestellte Sequenz ist das aus *Ashbya gossypii* erhaltene Genprodukt des GUA1 Gens (SEQ ID NO:7).

[0018] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein mit der in SEQ ID NO:11 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO:11 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 10% der Aminosäuren erhältlichen Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer GMP-Synthetase.

[0019] Die in SEQ ID NO:11 dargestellte Sequenz ist das aus *Ashbya gossypii* erhaltene Genprodukt des GUA2 Gens (SEQ ID NO:10).

[0020] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein mit der in SEQ ID NO:13 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO:13 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 10% der Aminosäuren erhältlichen Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer Phosphoribosylpyrophosphat-Synthetase.

[0021] Die in SEQ ID NO:13 dargestellte Sequenz ist das aus *Ashbya gossypii* erhaltene Genprodukt des KPR2 Gens (SEQ ID NO:12).

[0022] Diese genannten Genprodukte können durch übliche Verfahren der Gentechnologie wie ortsgerichtete Mutagenese so verändert werden, daß bestimmte Aminosäuren ausgetauscht, zusätzlich eingeführt oder entfernt werden. Üblicherweise (aber nicht ausschließlich) werden Aminosäurereste durch solche ähnlicher Raumerfüllung, Ladung oder Hydrophilie/Hydrophobie ausgetauscht um die enzymatischen Eigenschaften der Genprodukte nicht zu verlieren. Insbesondere im aktiven Zentrum führen Veränderungen der Aminosäuresequenz oft zu drastischer Veränderung der enzymatischen Aktivitäten. An anderen, weniger essentiellen Stellen werden jedoch Veränderungen der Aminosäuresequenz häufig toleriert.

[0023] Bei den erfindungsgemäßen Proteinen können

1. im Fall des Genproduktes des AgKPR1-Gens, bis zu 15, bevorzugt bis zu 10 und besonders bevorzugt bis zu 5% der Aminosäuren gegenüber der im Sequenzprotokoll dargestellten Sequenzen verändert sein;

2. im Fall des Genproduktes des AgADE4-Gens, bis zu 10 und besonders bevorzugt bis zu 5% der Aminosäuren gegenüber der im Sequenzprotokoll dargestellten Sequenzen verändert sein;

3. im Fall des Genproduktes des AgGUA1-Gens, bis zu 20, bevorzugt bis zu 15, besonders bevorzugt bis zu 10 und insbesondere bevorzugt bis zu 5% der Aminosäuren gegenüber der im Sequenzprotokoll dargestellten Sequenzen verändert sein;

4. im Fall des Genproduktes des AgGUA2-Gens, bis zu 10 und besonders bevorzugt bis zu 5% der Aminosäuren gegenüber der im Sequenzprotokoll dargestellten Sequenzen verändert sein;

5. im Fall des Genproduktes des AgKPR2 Gens bis zu 10 %, bevorzugt bis zu 7 % und besonders bevorzugt bis zu 5 % der Aminosäuren gegenüber der im Sequenzprotokoll dargestellten Sequenzen verändert sein.

[0024] Bevorzugt sind solche Proteine, die zwar noch die jeweilige enzymatische Aktivität besitzen, aber in ihrer Regulation verändert worden sind. Viele dieser Enzyme unterliegen einer starken Aktivitätskontrolle durch Zwischen- und Endprodukte (feedback-Inhibition). Dies führt dazu, daß die Enzyme, sobald genügend Endprodukt vorhanden ist, in ihrer Aktivität gedrosselt werden.

[0025] Diese im physiologischen Zustand ökonomische Regelung führt bei Produktionsstämmen jedoch häufig dazu, daß die Produktivität nicht über eine gewisse Grenze hinaus gesteigert werden kann. Durch Beseitigung einer solchen feedback-Inhibition erreicht man, daß die Enzyme ungeachtet der Endproduktkonzentration ihre Aktivität beibehalten und dadurch Stoffwechselengpässe umgangen werden. Dies führt letztlich zu einer deutlichen Steigerung der Riboflavinbiosynthese.

[0026] Bevorzugte erfindungsgemäße Proteine sind solche, die nicht mehr durch Folgeprodukte von Stoffwechselwegen (die von Produkten der Enzyme ausgehen) gehemmt werden. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Proteine sind solche, die nicht mehr durch Zwischenprodukte der Purinbiosynthese, insbesondere durch Purinbasen, Purinnukleoside, Purinnukleotid-5'-Monophosphate oder Purinnukleotid-5'-Diphosphate oder Purinnukleotid-5'-Triphosphate gehemmt werden. Insbesondere bevorzugte erfindungsgemäße Proteine sind solche, mit nachfolgenden Veränderungen der Aminosäuresequenz und alle Kombinationen von Aminosäuresequenz-Veränderungen, die diese nachfolgen-

den Veränderungen enthalten.

[0027] Veränderungen der Aminosäuresequenz am AgKPR1 Genprodukt:

Lysin an Position 7 ausgetauscht gegen Valin Aspartat an Position 52 ausgetauscht gegen Histidin Leucin an Position 131 ausgetauscht gegen Isoleucin Aspartat an Position 186 ausgetauscht gegen Histidin Alanin an Position 193 ausgetauscht gegen Valin Histidin an Position 196 ausgetauscht gegen Glutamin

[0028] Veränderungen der Aminosäuresequenz am AgADE4 Genprodukt:

Aspartat an Position 310 ausgetauscht gegen Valin Lysin an Position 333 ausgetauscht gegen Alanin Alanin an Position 417 ausgetauscht gegen Tryptophan

[0029] Die folgenden Beispiele beschreiben die Herstellung der erfindungsgemäßen Proteine und Nukleinsäuren sowie deren Verwendung zur Herstellung von Mikroorganismen mit gesteigerter Riboflavinsynthese.

Beispiel 1:

Herstellung einer genomischen Genbank aus *Ashbya gossypii* ATCC10895

[0030] Genomische DNA aus *Ashbya gossypii* ATCC10895 kann nach üblichen Verfahren präpariert werden, z.B. wie beschrieben in EP9703208. Die genomische Genbank, ausgehend von dieser DNA, kann nach üblichen Methoden (z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and sons) in beliebigen Plasmiden oder Cosmiden, wie z.B. SuperCos1 (Stratagene, La Jolla, USA) erstellt werden.

Beispiel 2:

Klonierung des Gens für PRPP-Synthetase aus *Ashbya gossypii* ATCC10895 (AgKPR1)

[0031] Die Klonierung des Gens für PRPP-Synthetase aus *Ashbya gossypii* (AgKPR1) kann über zwei Schritte verlaufen. Im ersten Schritt kann mit folgenden Oligonukleotiden einen definierten Bereich des KPR1 Gens aus genomischer DNA von *Ashbya gossypii* über PCR amplifizieren:

KPR5: 5'- GATGCTAGAGACCGCGGGGTGCAAC -3'

KPR3: 5'- TGTCCGCCATGTCGTCTACAATAATA -3'

[0032] Die PCR kann nach üblicher Methode durchgeführt werden. Das resultierende 330 bp DNA Fragment kann mit üblichen Methoden in den Vektor pGEMT (Promega, Madison, USA) kloniert und sequenziert werden.

[0033] Mit dieser Nukleotidsequenz als Sonde kann mit üblichen Methoden eine genomische Cosmid-Genbank gescreent werden. Von einem Cosmid, das ein Signal mit dieser Sonde ergibt, kann dann ein 1911 bp PstI-HindIII Fragment in den Vektor pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, USA) subkloniert werden. Auf diesem Fragment liegen das KPR1 Gen und unvollständige ORFs, die Homologie zeigen zu den UBC6 und UBP9 Genen aus *Saccharomyces cerevisiae*.

[0034] Die PRPP-Synthetase KPR2 und die putative PRPP-Synthetase KPR4 aus *Saccharomyces cerevisiae* sind die Enzyme, die der PRPP-Synthetase aus *Ashbya gossypii* mit Ähnlichkeiten von 80,2% bzw. 79,6% am verwandtesten sind. Die KPR2 und KPR4 Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* sind zu 67,6% bzw. 67,8% ähnlich zum KPR1 Gen aus *Ashbya gossypii*. Andere Enzyme bzw. Gene aus anderen Organismen sind deutlich verschiedener zum KPR1 Gen bzw. zur PRPP-Synthetase aus *Ashbya gossypii*.

[0035] Die Sequenzvergleiche können z.B. mit dem Clustal Algorithmus mit Hilfe der PAM250 Gewichtungstabelle oder dem Wilbur-Lipman DNA alignment Algorithmus (wie z.B. in dem Programmpaket MegAlign 3.06 der Firma DNAstar implementiert) durchgeführt werden. Mit dem beschriebenen Oligonukleotide-Paar ist es nicht möglich, die Gene für die verschiedenen PRPP-Synthetasen aus *Saccharomyces cerevisiae* zu amplifizieren.

[0036] Mit der Sonde kann man auch noch einen Klon aus der Genbank finden. Dieser zweite Klon zeigte ein Gen, das ebenfalls für eine PRPP Synthetase kodiert. Dieses Gen wird AgKPR2 genannt und ist deutlich verschieden zu AgKPR1. AgKPR2 zeigt auf Aminosäureebene 66 % Identität zu AgKPR1. Das AgKPR2 Gen (SEQ ID NO: 12) wurde mit allen Proteinen der Swissprot Datenbank verglichen. Die maximale Ähnlichkeit zeigt dieses Protein (88 % Identität bzw. 95 % Ähnlichkeit) zum KPR3 Genprodukt aus *Saccharomyces cerevisiae*. Das Genprodukt des AgKPR1 Gens ist für den überwiegenden Teil der Aktivität der PRPP Synthetase bei *Ashbya gossypii* verantwortlich. Wenn man das AgKPR1 Gen von *Ashbya gossypii* disruptiert (analog zur Disruption anderer *Ashbya* Gene, wie in den Beschreibungen in den Beispielen 6-8), dann findet man deutlich verringerte Enzymaktivität: statt 22 U/mg Protein nur noch 3 U/mg Pro-

tein. Zur Analytik siehe Beispiel 13. In Beispiel 11, 13 und 15 werden Ausführungsbeispiele mit dem AgKPR1 Gen gezeigt, man kann solche Arbeiten aber auch mit AgKPR2 durchführen.

Beispiel 3:

Klonierung des Gens für Glutamin-PRPP-Amidotransferase aus *Ashbya gossypii* ATCC10895 (AgADE4)

[0037] Die Klonierung des Gens für Glutamin-PRPP-Amidotransferase aus *Ashbya gossypii* (AgADE4) kann über zwei Schritte verlaufen. Im ersten Schritt kann mit folgenden Oligonukleotiden einen definierten Bereich des AgADE4 Gens aus genomischer DNA von *Ashbya gossypii* über PCR amplifizieren:

ADE4A: 5'- ATATCTTGATGAAGACGTTACCGT -3'

ADE4B: 5'- GATAATGACGGCTTGCCGGGAAGA -3'

[0038] Die PCR kann nach üblicher Methode durchgeführt werden. Das resultierende 360 bp DNA Fragment kann mit üblichen Methoden in den Vektor pGEMT (Promega, Madison, USA) kloniert und dann sequenziert werden.

[0039] Mit dieser Sequenz als Sonde kann mit üblichen Methoden eine genomische Cosmid-Genbank gescreent werden. Von einem Cosmid, das ein Signal mit dieser Sonde ergibt, kann dann ein 5369 bp HindIII Fragment in den Vektor pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, USA) subkloniert werden. Auf diesem Fragment liegen das AgADE4 Gen und das Gen für das *Ashbya* Homolog für den mitochondrialen ABC Transporter ATM1 aus *Saccharomyces cerevisiae* und ein weiterer offener Leseraster, dessen Funktion nicht bekannt ist.

[0040] Das AgADE4 Genprodukt (Glutamin-PRPP-Amidotransferase) zeigt die deutlichste Ähnlichkeit zu den ADE4 Genprodukten aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces kluyveri* (81% bzw. 86.3%). Die entsprechenden Gene sind jedoch nur zu 68.8% bzw. 72% homolog. Die Ähnlichkeit zu anderen Glutamin-PRPP-Amidotransferasen ist deutlich geringer (z.B. nur 27.5% Ähnlichkeit zum entsprechenden Enzym aus *Bacillus subtilis*). Die Sequenzvergleiche kann man so durchführen, wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0041] Es ist mit dem beschriebenen Paar an Oligonukleotiden nicht möglich, die ADE4 Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* oder *Saccharomyces kluyveri* zu amplifizieren.

Beispiel 4:

Klonierung des Gens für Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase aus *Ashbya gossypii* ATCC10895 (AgGUA1)

[0042] Die Klonierung des Gens für Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase aus *Ashbya gossypii* (AgGUA1) kann über zwei Schritte verlaufen.

[0043] Im ersten Schritt kann man mit folgenden Oligonukleotiden einen definierten Bereich des AgGUA1 Gens aus genomischer DNA von *Ashbya gossypii* über PCR amplifizieren:

IMP5: 5'- GGCATCAACCTCGAGGAGGCGAACC -3'

IMP3: 5'- CAGACCGGCCTCGACCAGCATCGCC - 3'

[0044] Die PCR kann nach üblicher Methode durchgeführt werden. Das resultierende 230 bp DNA Fragment kann mit üblichen Methoden in den Vektor pGEMT (Promega, Madison, USA) kloniert und dann sequenziert werden.

[0045] Mit dieser Sequenz als Sonde kann mit üblichen Methoden eine genomische Cosmid-Genbank gescreent werden. Von einem Cosmid, das ein Signal mit dieser Sonde ergibt, kann ein 3616 bp ApaI Fragment in den Vektor pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, USA) subkloniert werden. Die kodierende Region des AgGUA1 Gens ist 1569 bp lang und ist unterbrochen von einem 161 bp langen Intron. Die Intron Grenzen (5' splice site AGGTATGT und 3' splice site CAG) kann man durch Klonierung und Sequenzierung von AgGUA1cDNA verifizieren.

[0046] AgGUA1 ist das erste beschriebene Gen aus *Ashbya gossypii* mit einem Intron.

[0047] Das AgGUA1 Genprodukt (IMP-Dehydrogenase) zeigt die deutlichste Ähnlichkeit zu den 4 IMP-Dehydrogenasen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Ähnlichkeiten zwischen 67% und 77.2%). Die Ähnlichkeit zu anderen IMP-Dehydrogenasen ist deutlich geringer. Die Sequenzvergleiche kann man so durchführen, wie in Beispiel 2 beschrieben. *Ashbya gossypii* scheint nur ein Gen für dieses Enzym zu haben. Dies kann man durch southern blotting mit genomischer DNA von *Ashbya gossypii* mit Hilfe der oben genannten Sonde zeigen.

[0048] Das Gen aus *Saccharomyces cerevisiae*, das für die dem AgGUA1 Genprodukt ähnlichste IMP-Dehydrogenase kodiert (IMH3), hat eine Ähnlichkeit von 70.2% zum AgGUA1 Gen. Es ist mit dem beschriebenen Paar an Oligonukleotiden nicht möglich, dieses Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* zu amplifizieren.

Beispiel 5:

Klonierung des Gens für Guanosin-Monophosphat-Synthetase aus *Ashbya gossypii* ATCC10895 (AgGUA2)

- 5 [0049] Die Klonierung des Gens für Guanosin-Monophosphat-Synthetase aus *Ashbya gossypii* (AgGUA2) kann über zwei Schritte verlaufen. Im ersten Schritt kann man mit folgenden Oligonukleotiden einen definierten Bereich des AgGUA2 Gens aus genomischer DNA von *Ashbya gossypii* über PCR amplifizieren:
- GUA2A: 5'- TGGACCGGGCGGTGTTTCGAGTTGGG -3'
- GUA2B: 5'- AGGCTGGATCCTGGCTGCCTCGCGC -3'
- 10 [0050] Die PCR Reaktion kann nach üblicher Methode durchgeführt werden. Das resultierende 750 bp DNA Fragment kann mit üblichen Methoden in den Vektor pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, USA) kloniert und dann sequenziert werden.
- [0051] Mit dieser Sequenz als Sonde kann mit üblichen Methoden eine genomische Cosmid-Genbank gescreent werden. Von einem Cosmid, das ein Signal mit dieser Sonde ergibt, kann dann ein 2697 bp ClaI-EcoRV Fragment in den
- 15 Vektor pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, USA) subkloniert werden.
- [0052] Das AgGUA2 Genprodukt (GMP-Synthetase) zeigt die deutlichste Ähnlichkeit zu GMP-Synthetase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Ähnlichkeiten 86.6%). Die Gene für die GMP-Synthetasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Ashbya gossypii* sind zu 71.2% homolog. Die Ähnlichkeit des AgGUA2 Genproduktes zu anderen IMP-Dehydrogenasen ist deutlich geringer. Die Sequenzvergleiche kann man so durchführen, wie in Beispiel 2 beschrieben.
- 20 [0053] Es ist mit dem beschriebenen Paar an Oligonukleotiden nicht möglich, das GMP-Synthetase Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* zu amplifizieren.

Beispiel 6:

- 25 Disruption des AgADE4 Gens von *Ashbya gossypii* ATCC10895

- [0054] Unter Disruption eines Gens versteht man die Zerstörung der Funktionalität einer genomischen Kopie des Gens entweder durch (a) Entfernen eines Teiles der Gensequenz, oder durch (b) der Unterbrechung des Gens durch Einfügung eines Stückes Fremd-DNA in das Gen oder durch (c) Ersatz eines Teil des Gens durch Fremd-DNA. Die verwendete Fremd-DNA ist beliebig, bevorzugt aber ein Gen, das Resistenz gegen eine beliebige Chemikalie bewirkt. Zur
- 30 Disruption von Genen können beliebige Resistenzgene verwendet werden.
- [0055] Zur Disruption des AgADE4-Gens von *Ashbya gossypii* ATCC10895 kann man ein Gen verwenden, das Resistenz gegen G418 vermittelt. Es kann sich dabei um das Kanamycin-Resistenzgen aus TN903, unter Kontrolle des TEF-Promotors von *Ashbya gossypii* (siehe z.B. Yeast 10, S.1793-1808, 1994, WO9200379) handeln. Das Gen ist 5' und 3' von mehreren Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen flankiert, so daß eine Kassette aufgebaut wurde, die beliebige Konstruktionen von Gen-Disruptionen mit üblichen Methoden der in vitro Manipulation von DNA ermöglichen.
- 35 [0056] Das interne HincII Fragment von AgADE4 (zwischen den Positionen 2366 und 2924) kann durch eine wie oben skizzierte Resistenzkassette ersetzt werden. Das erhaltene Konstrukt erhält den Namen *ade4::G418*.
- [0057] Das erhaltene Plasmid kann man in *E.coli* vermehren. Das BamHI / BglII- Fragment des Konstruktes *ade4::G418* kann präpariert, über Agarosegel-Elektrophorese und nachfolgende Elution der DNA aus dem Gel (siehe Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619, 1979) aufgereinigt und zur Transformation von *Ashbya gossypii* eingesetzt werden.
- 40 [0058] *Ashbya gossypii* kann durch Protoplastentransformation (Gene 109, 99-105, 1991), bevorzugt aber durch Elektroporation (BioRad Gene Pulser, Bedingungen: Küvetten mit Spaltbreite 0,4 mm, 1500V, 25µF, 100Ω) transformiert werden. Die Selektion transformierter Zellen erfolgt auf G418-haltigem Festmedium.
- [0059] Erhaltene G418-resistente Klone können mit üblichen Methoden der PCR und Southern-Blot Analyse daraufhin untersucht werden, ob die genomische Kopie des AgADE4 Gens tatsächlich zerstört ist. Klone, deren AgADE4 Gen zerstört ist, sind Purin- auxotroph.

50 Beispiel 7:

Disruption des AgGUA1 Gens von *Ashbya gossypii* ATCC10895

- [0060] Zur prinzipiellen Beschreibung der Disruption von Genen, der Verwendung einer Resistenzkassette und der
- 55 Transformation von *Ashbya gossypii* siehe Beispiel 6.
- [0061] Das interne XhoI / KpnI Fragment von AgGUA1 (zwischen den Positionen 1620 und 2061) kann durch eine wie oben skizzierte Resistenzkassette ersetzt werden. Das erhaltene Konstrukt erhält den Namen *gua1::G418*.
- [0062] Das erhaltene Plasmid kann in *E.coli* vermehrt werden. Das XbaI / BamHI - Fragment des Konstruktes

gua1::G418 kann präpariert, über Agarosegel-Elektrophorese und nachfolgende Elution der DNA aus dem Gel aufgereinigt und zur Transformation von *Ashbya gossypii* eingesetzt werden.

[0063] Erhaltene G418-resistente Klone können mit üblichen Methoden der PCR und Southern-Blot Analyse daraufhin untersucht werden, ob die genomische Kopie des AgGUA1 Gens tatsächlich zerstört ist. Klone, deren AgGUA1 Gen zerstört ist, sind Guanin- auxotroph.

Beispiel 8:

Disruption des AgGUA2 Gens von *Ashbya gossypii* ATCC10895

[0064] Zur prinzipiellen Beschreibung der Disruption von Genen, der Verwendung einer Resistenzkassette und der Transformation von *Ashbya gossypii* siehe Beispiel 6.

[0065] Das interne Sall Fragment von AgGUA2 (zwischen den Positionen 1153 und 1219) kann man durch eine wie oben skizzierte Resistenzkassette ersetzen. Das erhaltene Konstrukt erhält den Namen gua2::G418.

[0066] Das erhaltene Plasmid kann in *E.coli* vermehrt werden. Das XbaI / BamHI - Fragment des Konstruktes gua2::G418 kann präpariert, über Agarosegel-Elektrophorese und nachfolgende Elution der DNA aus dem Gel aufgereinigt und zur Transformation von *Ashbya gossypii* eingesetzt werden.

[0067] Erhaltene G418-resistente Klone können mit üblichen Methoden der PCR und Southern-Blot Analyse daraufhin untersucht werden, ob die genomische Kopie des AgGUA2 Gens tatsächlich zerstört ist. Klone, deren AgGUA2 Gen zerstört ist, sind Guanin- auxotroph.

Beispiel 9:

Klonierung des GAP-Promotors aus *Ashbya gossypii*

[0068] Das Gen für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *Ashbya gossypii* (AgGAP) kann man durch ein allgemein übliches Screening einer genomischen *Ashbya gossypii* Cosmid-Genbank (siehe Beispiel 1, mit einer Sonde, die aus Sequenzinformationen des GAP Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* erstellt wurde) klonieren.

[0069] Der 5' nicht-translatierte Bereich des Gens (-373 bis -8 Region, bezogen auf den Translationsstart) wurde als Promotor angenommen. Flankierend zu dieser Sequenz wurden 2 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI eingeführt. In diesem Bereich findet man die bona fide TATA Box (nt 224-230), zwei Sequenzabschnitte (nt 43-51 und 77-85), die dem sogenannten GCR1 binding element und einen Sequenzabschnitt, (nt 9-20) dessen Komplement partial dem RAP1 binding element von *Saccharomyces cerevisiae* entspricht (siehe z.B. Johnston, M. und Carlson, M. (1992) pp.193-281 in *The molecular biology and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Gene expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Die so konstruierte Promotorkassette kann als einfach portierbares Expressionssignal vor jedes beliebige Gen für die Überexpression in *Ashbya gossypii* gesetzt werden und führt zu deutlicher Überexpression von Genen in *Ashbya gossypii*, wie gezeigt in Beispiel 11.

Beispiel 10:

Konstruktion von Plasmiden mit Genen unter Kontrolle des GAP-Promotors aus *Ashbya gossypii*

[0070] Zur Einfügung der GAP-Promotorkassette 5' der kodierenden Region des AgADE4 Gens wurde nach üblichen Methode (z.B. Clover, D.M. und Hames, B.D. (1995) *DNA cloning* Vol.1, IRL press) 8 bp 5' des ATG Startcodons eine singuläre NotI Schnittstelle (Erkennungssequenz GCGGCCGC) eingeführt.

[0071] Die GAP-Promotorkassette kann dann über NotI in diese Position eingefügt werden. Analog kann man vorgehen bei der Klonierung der GAP-Promotorkassette 5' der kodierenden Region der Gene AgKPR1, AgGUA1, AgGUA2 sowie bei Varianten der Gene AgADE4, AgKPR1, AgGUA1 und AgGUA2.

[0072] In *Ashbya gossypii* wird die Expression der Gene, die die GAP-Promotorkassette 5' der kodierenden Region tragen durch den GAP-Promotor kontrolliert.

Beispiel 11:

Überexpression Genen in *Ashbya gossypii* unter Kontrolle des GAP-Promotors

[0073] Die Transformation von *Ashbya gossypii* mit den in Beispiel 10 beschriebenen DNA-Konstrukten kann man durchführen wie in Beispiel 6 beschrieben. Als Empfänger können bevorzugt, aber nicht ausschließlich, solche Klone dienen, die vor der hier durchzuführenden Transformation eine Disruption des zu überexprimierenden Gens tragen. So

kann man z.B. die in Beispiel 6 beschriebene Mutante von *Ashbya gossypii*, die eine *ade4::G418* Mutation trägt, mit einem in Beispiel 10 beschriebenen GAP-ADE4 Konstrukt transformieren. Man kann die Integration des Konstruktes in das Genom durch Southern-Blot-Analyse verifizieren. Die resultierenden Klone tragen kein G418 Resistenzgen mehr (sind somit G418 sensitiv) und sind Purin-prototroph. Die Überexpression kann durch Northern-Blot-Analyse oder Nachweis der enzymatischen Aktivität (wie in Beispiel 12 beschrieben) nachgewiesen werden. Bei Expression des AgADE4 Gens unter dem natürlichen Promotor kann man 0,007 U/mg Protein nachweisen. Bei Expression des AgADE4 Gens unter dem GAP Promotor kann man 0,382 U/mg Protein nachweisen

[0074] Ein Sequenzabschnitt der kodierenden Region des AgADE4 Gens kann als Sonde verwendet werden. Analog kann man mit AgKPR1, AgGUA1, AgGUA2 sowie bei Varianten all dieser Gene vorgehen. Außerdem kann man Kombinationen aus einem dieser Gene, zusammen mit anderen Genen auf diese Weise in das Genom von *Ashbya gossypii* einbringen.

[0075] Der *Ashbya gossypii* Wild-Typ hat eine spezifische PRPP Synthetase Aktivität von 22 U/mg Protein (zur Analytik der PRPP-Synthetase siehe Beispiel 13). Bei Expression des AgKPR1-Gens unter dem GAP-Promotor kann man 855 U/mg Protein nachweisen.

Beispiel 12:

[0076] Varianten des AgADE4 Genproduktes (Glutamin-PRPP-Amidotransferase), die nicht mehr feedback durch Purine oder Zwischenprodukte der Purinsynthese gehemmt werden.

[0077] Glutamin-PRPP-Amidotransferasen werden durch Purin-Nukleotide feedback inhibiert. Diese Inhibition findet man in zahlreichen Organismen (siehe z.B. Switzer, R.L. (1989) Regulation of bacterial Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase, in: Allosteric enzymes pp. 129-151, CRC press, Boca Raton).

[0078] Die Glutamin-PRPP-Amidotransferase aus *Ashbya gossypii* wird ebenfalls durch AMP oder GMP gehemmt (siehe Abbildung). Die Aktivität der Glutamin Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus *Ashbya gossypii* kann man messen, wie beschrieben in Messenger und Zalkin (1979) J. Biol. Chem. 254, Seite 3382-3392.

[0079] Man kann veränderte Glutamin Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferasen konstruieren, die nicht mehr durch Purine gehemmt werden. Es ist offensichtlich, daß die Überexpression solch deregulierter Enzyme den Purinstoffwechsel deutlich mehr verstärken als die Überexpression der feedback inhibierten Enzyme. Veränderungen der Sequenz des AgADE4 Gens können nach üblichen Methoden (z.B. Clover, D.M. und Hames, B.D. (1995) DNA cloning Vol.1, IRL press) vorgenommen werden. Man kann z.B. folgende Aminosäuren der Glutamin Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase ausgetauschen:

[0080] Das Codon, das für Aspartat an der Position 310 kodiert, kann durch ein Codon ersetzt werden, das für Valin kodiert. Das Codon, das für Lysin an der Position 333 kodiert, kann durch ein Codon ersetzt werden, das für Alanin kodiert. Das Codon, das für Alanin an der Position 417 kodiert, kann durch ein Codon ersetzt werden, das für Tryptophan kodiert. Zusätzlich können AgADE4 Gene konstruiert werden, die Kombinationen dieser Austausche tragen.

[0081] Alle Enzyme, die den D310V, den K333A, den A417W oder jede Kombination von Austauschen tragen, die D310V oder K333A enthalten, zeigen verringerte feedback Inhibition durch AMP und GMP (siehe Abbildung). Dies kann z.B. nach Expression der Enzyme in *Ashbya gossypii* (siehe Beispiel 11) gezeigt werden.

Beispiel 13:

[0082] Varianten des AgKPR1 Genproduktes (PRPP-Synthetase), die nicht mehr feedback durch Purine oder Zwischenprodukte der Purinsynthese gehemmt werden.

[0083] PRPP-Synthetasen werden feedback durch Purine, Pyrimidine und Aminosäuren inhibiert. Diese Inhibition findet man in zahlreichen Organismen (siehe z.B. Gibson, K.J. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2391-2396; Tatibana, M. et al. (1995) Adv., Enzyme Regul. 35, 229-249 und darin zitierte Arbeiten).

[0084] In der Forschung der klinischen Medizin sind Fälle erblicher Gicht beschrieben, deren Basis eine verstärkte Purinbiosynthese ist. Die molekulare Ursache hierfür ist eine sogenannte Superaktivität der humanen PRPP Synthetase (siehe z.B. Amer. J. Med. 55 (1973) 232-242; J. Clin. Invest. 96 (1995) 2133-2141; J. Biol. 268 (1993) 26476-26481). Die Basis hierfür kann eine Mutation sein, die dazu führt, daß das Enzym nicht mehr durch Purine feedback inhibiert wird.

Die Aktivität der PRPP Synthetase aus *Ashbya gossypii* kann man messen wie in Anal. Biochem. 98 (1979) 254-263 oder J. Bacteriol. 174 (1992) 6852-6856 beschrieben. Die spezifische Aktivität (U/mg) wird über die Menge an entstandenem Produkt definiert (nmol/min/mg Protein).

Man kann veränderte PRPP Synthetasen konstruieren, die nicht mehr durch Purine gehemmt werden. Es ist offensichtlich, daß die Überexpression solch deregulierter Enzyme den Purinstoffwechsel deutlich mehr verstärkt als die Überexpression der feedback inhibierten Enzyme. Veränderungen der Sequenz des AgKPR1 Gens können nach üblichen Methoden (z.B. Glover, D.M. und Hames, B.D. (1995) DNA cloning Vol. 1, IRL press) vorgenommen werden. Man kann

z.B. folgende Aminosäuren der PRPP Synthetase austauschen:

Das Codon, das für Leucin an der Position 131 kodiert, kann durch ein Codon ersetzt werden, das für Isoleucin kodiert. Das Codon, das für Histidin an der Position 196 kodiert, kann durch ein Codon ersetzt werden, das für Glutamin kodiert. Alle Enzyme, die einen dieser Aminosäureaustausche (L 131 oder H196Q) tragen, zeigen verringerte feedback Hemmung durch Purine. In Abbildung 2 ist dies gezeigt am Beispiel ADP.

Dies kann gezeigt werden, nachdem die entsprechenden Enzyme in *Ashbya gossypii* exprimiert wurden. Dies kann entsprechend Beispiel 11 durchgeführt werden.

Beispiel 14:

[0085] Varianten des AgGUA1 Genproduktes (IMP-Dehydrogenase), die nicht mehr feedback durch Purine oder Zwischenprodukte der Purinsynthese gehemmt werden.

Beispiel 15:

Auswirkung der Verstärkung und/oder der Optimierung von Purinstoffwechsel-Enzymen und deren Gene auf die Riboflavin-Produktion in *Ashbya gossypii*

[0086] Man kann den Ausgangsstamm *Ashbya gossypii* ATCC10895, in Vergleich mit davon abgeleiteten Klonen, die chromosomale Kopien von Genen, unter Kontrolle des GAP Promotors tragen (wie in Beispiel 11 beschrieben), im Schüttelkolben auf Riboflavin-Produktivität prüfen. Man kann dazu 300 ml Schüttelkolben, mit 20 ml YPD Medium (Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) bei einer Inkubationstemperatur von 28°C einsetzen.

[0087] Nach 2 Tagen produziert der Kontrollstamm durchschnittlich 14,5 mg Riboflavin pro l Kulturbrühe. Stämme, die Gene für Purinstoffwechsel-Enzyme überexprimieren (wie z.B. in Beispiel 11 gezeigt) oder Gene für optimierte Purinstoffwechsel-Enzyme (z.B. wie in den Beispielen 12, 13, und 14) überexprimieren, produzieren mehr Riboflavin. So produziert der Stamm, der AgADE4D310VK333A (Beispiel 12) überexprimiert, in 2 Tagen durchschnittlich 45,4 mg Riboflavin pro l Kulturbrühe.

[0088] Der Stamm, der AgKPR1 unter dem GAP-Promotor überexprimiert, produziert statt 14 mg/l (wie der WT) 36 mg/l Riboflavin. Der Stamm, der AgKPR1H196Q unter dem GAP-Promotor überexprimiert, produziert 51 mg/l Riboflavin.

Abbildung 1:

[0089] Messung der Aktivität der Gln-PRPP-Amidotransferase aus *A. gossypii* und von veränderten Formen des Enzyms in Abhängigkeit der Konzentration von Adenosin-5'-Monophosphat (AMP) und Guanosin-5'-Monophosphat (GMP).

WT: Gln-PRPP-Amidotransferase

A418W: Gln-PRPP-Amidotransferase, Alanin an Position 418 ausgetauscht gegen Tryptophan.

K333A: Gln-PRPP-Amidotransferase, Lysin an Position 333 ausgetauscht gegen Alanin.

D310VK333A: Gln-PRPP-Amidotransferase, Aspartat an Position 310 ausgetauscht gegen Valin und Lysin an Position 333 ausgetauscht gegen Alanin.

Abbildung 2:

[0090] Messung der Aktivität der PRPP Synthetase aus *A. gossypii* und von veränderten Formen des Enzyms in Abhängigkeit der Konzentration von Adenosin-5'-Diphosphat (ADP)

WT: PRPP Synthetase

L131I: PRPP Synthetase, Leucin an Position 131 ausgetauscht gegen Isoleucin

H196Q: PRPP Synthetase, Histidin an Position 196 ausgetauscht gegen Glutamin

H196Q, L131I: PRPP Synthetase, Histidin an Position 196 ausgetauscht gegen Glutamin und Leucin an Position 131 ausgetauscht gegen Isoleucin

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056
- (G) TELEPHON: 0621/6048526
- (H) TELEFAX: 0621/6043123
- (I) TELEX: 1762175170

(ii) ANMELDETITEL: Gene der Purinbiosynthese aus *Ashbya gossypii*
und deren Verwendung in der mikrobiellen
Riboflavinbiosynthese

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 13

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1911 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..625

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 626..1582

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE: 1583..1911

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | | |
|----|---|-----|
| | GGTAGTCGCT CATCGACAGA CACAATCGCG TGTTCTCTCT GAATCGTCCA TTGGGTGTCA | 60 |
| 5 | GCATCCTGAT CGCGGGCGGA TGAATGGGT AATCATTAGG AAACACCAAT GTCCCATGGT | 120 |
| | ATTGTCCGTC CTCGTATGGT GTCTCAGGAG GACCCGTGAT CACGTAGTGC CACACCAGGA | 180 |
| | TATTGTCTTC CTTTGGTGCT GCCACGATGT AGGGCGGGGG GTTCTCGGTC ATCATTTTGT | 240 |
| 10 | ACTCCTTTGA GAGCCGCTTG TACGCCTGTC TTGATGCCAT CTTGCCTACT ATTAGTTTCT | 300 |
| | CACCACTTCC CGCCAAACAA TCTGCACTTT ACGAGCGCTA TCTATCCCTC GGGTCGCTCT | 360 |
| | AGTTGATTAT TGGCGAAACT GATAGTTCAG GTACTTCCAT GATGCGGTCA TATCCACGTA | 420 |
| 15 | TGTGATCACG TGATCATCAG CCATGCTGCC AGCTCACGGG CCTGCCTACA CTATTGGAGG | 480 |
| | CTCTGTGAGT CATGATTTAT TGCATATCAA GCCCAGATAG TCGTTGGGGA TACTACCGTT | 540 |
| 20 | GCCGCGATGA GCTCCGATAT TAAGTTGTAG CAAAAATTT TAACGGATGA CTTCTTAACA | 600 |
| | GTTATTGACG CCGCAATCCT ACGCC ATG TCG TCC AAT AGC ATA AAG CTG CTA | 652 |
| | Met Ser Ser Asn Ser Ile Lys Leu Leu | |
| | 1 5 | |
| 25 | GCA GGT AAC TCG CAC CCG GAC CTA GCT GAG AAG GTC TCC GTT CGC CTA | 700 |
| | Ala Gly Asn Ser His Pro Asp Leu Ala Glu Lys Val Ser Val Arg Leu | |
| | 10 15 20 25 | |
| 30 | GGT GTA CCA CTT TCG AAG ATT GGA GTG TAT CAC TAC TCT AAC AAA GAG | 748 |
| | Gly Val Pro Leu Ser Lys Ile Gly Val Tyr His Tyr Ser Asn Lys Glu | |
| | 30 35 40 | |
| | ACG TCA GTT ACT ATC GGC GAA AGT ATC CGT GAT GAA GAT GTC TAC ATC | 796 |
| 35 | Thr Ser Val Thr Ile Gly Glu Ser Ile Arg Asp Glu Asp Val Tyr Ile | |
| | 45 50 55 | |
| | ATC CAG ACA GGA ACG GGG GAG CAG GAA ATC AAC GAC TTC CTC ATG GAA | 844 |
| | Ile Gln Thr Gly Thr Gly Glu Gln Glu Ile Asn Asp Phe Leu Met Glu | |
| 40 | 60 65 70 | |
| | CTG CTC ATC ATG ATC CAT GCC TGC CGG TCA GCC TCT GCG CGG AAG ATC | 892 |
| | Leu Leu Ile Met Ile His Ala Cys Arg Ser Ala Ser Ala Arg Lys Ile | |
| | 75 80 85 | |
| 45 | ACA GCG GTT ATA CCA AAC TTC CCT TAC GCA AGA CAA GAC AAA AAG GAC | 940 |
| | Thr Ala Val Ile Pro Asn Phe Pro Tyr Ala Arg Gln Asp Lys Lys Asp | |
| | 90 95 100 105 | |
| 50 | AAG TCG CGA GCA CCG ATA ACT GCC AAG CTG GTG GCC AAG ATG CTA GAG | 988 |
| | Lys Ser Arg Ala Pro Ile Thr Ala Lys Leu Val Ala Lys Met Leu Glu | |
| | 110 115 120 | |

55

ACC GCG GGG TGC AAC CAC GTT ATC ACG ATG GAT TTG CAC GCG TCT CAA 1036
 Thr Ala Gly Cys Asn His Val Ile Thr Met Asp Leu His Ala Ser Gln
 125 130 135
 5
 ATT CAG GGT TTC TTC CAC ATT CCA GTG GAC AAC CTA TAT GCA GAG CCG 1084
 Ile Gln Gly Phe Phe His Ile Pro Val Asp Asn Leu Tyr Ala Glu Pro
 140 145 150
 10
 AAC ATC CTG CAC TAC ATC CAA CAT AAT GTG GAC TTC CAG AAT AGT ATG 1132
 Asn Ile Leu His Tyr Ile Gln His Asn Val Asp Phe Gln Asn Ser Met
 155 160 165
 15
 TTG GTC GCG CCA GAC GCG GGG TCG GCG AAG CGC ACG TCG ACG CTT TCG 1180
 Leu Val Ala Pro Asp Ala Gly Ser Ala Lys Arg Thr Ser Thr Leu Ser
 170 175 180 185
 GAC AAG CTG AAT CTC AAC TTC GCG TTG ATC CAC AAA GAA CGG CAG AAG 1228
 Asp Lys Leu Asn Leu Asn Phe Ala Leu Ile His Lys Glu Arg Gln Lys
 190 195 200
 20
 GCG AAC GAG GTC TCG CGG ATG GTG TTG GTG GGT GAT GTC GCC GAC AAG 1276
 Ala Asn Glu Val Ser Arg Met Val Leu Val Gly Asp Val Ala Asp Lys
 205 210 215
 25
 TCC TGT ATT ATT GTA GAC GAC ATG GCG GAC ACG TGC GGA ACG CTA GTG 1324
 Ser Cys Ile Ile Val Asp Asp Met Ala Asp Thr Cys Gly Thr Leu Val
 220 225 230
 30
 AAG GCC ACT GAC ACG CTG ATC GAA AAT TGT GCG AAA GAA GTG ATT GCC 1372
 Lys Ala Thr Asp Thr Leu Ile Glu Asn Cys Ala Lys Glu Val Ile Ala
 235 240 245
 35
 ATT GTG ACA CAC GGT ATA TTT TCT GGC GGC GCC CGC GAG AAG TTG CGC 1420
 Ile Val Thr His Gly Ile Phe Ser Gly Gly Ala Arg Glu Lys Leu Arg
 250 255 260 265
 AAC AGC AAG CTG GCA CGG ATC GTA AGC ACA AAT ACG GTG CCA GTG GAC 1468
 Asn Ser Lys Leu Ala Arg Ile Val Ser Thr Asn Thr Val Pro Val Asp
 270 275 280
 40
 CTC AAT CTA GAT ATC TAC CAC CAA ATT GAC ATT AGT GCC ATT TTG GCC 1516
 Leu Asn Leu Asp Ile Tyr His Gln Ile Asp Ile Ser Ala Ile Leu Ala
 285 290 295
 45
 GAG GCA ATT AGA AGG CTT CAC AAC GGG GAA AGT GTG TCG TAC CTG TTC 1564
 Glu Ala Ile Arg Arg Leu His Asn Gly Glu Ser Val Ser Tyr Leu Phe
 300 305 310
 50
 AAT AAC GCT GTC ATG TAGTGCTGTC AGTGGCAGAT GCATGATCGC TGGCCTAATT 1619
 Asn Asn Ala Val Met
 315
 55
 ATCTGTGTAA GTTGATACAA TGCAGTAAAT ACASTACATA AAACCTGAATG TTTTTCACCTT 1679

AGGGGTGCTT TGTGTGTTCTG ATAGCGTGTG TGCGAATTTG GAGGTGAAAG TTGAACATCA 1739
 CGTAATGAAT ACAAACAAGA TTGCACATTA GGAAAAGCGA TAAATTATTT ATTATTTGCA 1799
 5 ACTGGCCTTT GAGCGTTTAA GCCTGAACAT TTTTGCCCTT TTGTTTGACC GTACCGTTAT 1859
 CACTCGTCCT TATATATGGC TATCCTTCTC TTCCGGAAC TCTTCGAGCG TA 1911

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 318 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Ser Asn Ser Ile Lys Leu Leu Ala Gly Asn Ser His Pro Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Glu Lys Val Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Leu Ser Lys Ile
 20 25 30
 Gly Val Tyr His Tyr Ser Asn Lys Glu Thr Ser Val Thr Ile Gly Glu
 35 40 45
 Ser Ile Arg Asp Glu Asp Val Tyr Ile Ile Gln Thr Gly Thr Gly Glu
 50 55 60
 Gln Glu Ile Asn Asp Phe Leu Met Glu Leu Leu Ile Met Ile His Ala
 65 70 75 80
 Cys Arg Ser Ala Ser Ala Arg Lys Ile Thr Ala Val Ile Pro Asn Phe
 85 90 95
 Pro Tyr Ala Arg Gln Asp Lys Lys Asp Lys Ser Arg Ala Pro Ile Thr
 100 105 110
 Ala Lys Leu Val Ala Lys Met Leu Glu Thr Ala Gly Cys Asn His Val
 115 120 125
 Ile Thr Met Asp Leu His Ala Ser Gln Ile Gln Gly Phe Phe His Ile
 130 135 140
 Pro Val Asp Asn Leu Tyr Ala Glu Pro Asn Ile Leu His Tyr Ile Gln
 145 150 155 160
 His Asn Val Asp Phe Gln Asn Ser Met Leu Val Ala Pro Asp Ala Gly
 165 170 175
 Ser Ala Lys Arg Thr Ser Thr Leu Ser Asp Lys Leu Asn Leu Asn Phe
 180 185 190

Ala Leu Ile His Lys Glu Arg Gln Lys Ala Asn Glu Val Ser Arg Met
195 200 205

5 Val Leu Val Gly Asp Val Ala Asp Lys Ser Cys Ile Ile Val Asp Asp
210 215 220

Met Ala Asp Thr Cys Gly Thr Leu Val Lys Ala Thr Asp Thr Leu Ile
225 230 235 240

10 Glu Asn Cys Ala Lys Glu Val Ile Ala Ile Val Thr His Gly Ile Phe
245 250 255

Ser Gly Gly Ala Arg Glu Lys Leu Arg Asn Ser Lys Leu Ala Arg Ile
260 265 270

15 Val Ser Thr Asn Thr Val Pro Val Asp Leu Asn Leu Asp Ile Tyr His
275 280 285

20 Gln Ile Asp Ile Ser Ala Ile Leu Ala Glu Ala Ile Arg Arg Leu His
290 295 300

Asn Gly Glu Ser Val Ser Tyr Leu Phe Asn Asn Ala Val Met
305 310 315

25 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 5369 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

30 (C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

35 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

40 (B) LAGE: 1..54

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

45 (B) LAGE: 55..1482

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1767..3299

50 (ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 3588..4703

55

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
(B) LAGE: 4704..5369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

| | | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------|-----|----|
| AAGCTTGACC | TTGGCTGGCA | CTTGAGTCGG | CAGACAGGTG | GACTAACCCG | AGCA | ATG | 57 |
| | | | | | | Met | |
| | | | | | | 1 | |
| GAT CGT GGT TGT AAA GGT ATC TCT TAT GTG CTC AGT GCA ATG GTT TTT | 105 | | | | | | |
| Asp Arg Gly Cys Lys Gly Ile Ser Tyr Val Leu Ser Ala Met Val Phe | | | | | | | |
| | 5 | | | | | 10 | |
| | | | | | | | |
| CAC ATA ATA CCG ATT ACA TTT GAA ATA TCG ATG GTA TGT GGC ATA TTG | 153 | | | | | | |
| His Ile Ile Pro Ile Thr Phe Glu Ile Ser Met Val Cys Gly Ile Leu | | | | | | | |
| | 20 | | | | | 25 | |
| | | | | | | | |
| ACA TAC CAG TTT GGT GCT TCC TTC GCT GCT ATA ACA TTC TCG ACT ATG | 201 | | | | | | |
| Thr Tyr Gln Phe Gly Ala Ser Phe Ala Ala Ile Thr Phe Ser Thr Met | | | | | | | |
| | 35 | | | | | 40 | |
| | | | | | | | |
| CTT CTT TAC TCC ATC TTT ACT TTC AGA ACG ACG GCG TGG CGC ACA CGG | 249 | | | | | | |
| Leu Leu Tyr Ser Ile Phe Thr Phe Arg Thr Thr Ala Trp Arg Thr Arg | | | | | | | |
| | 50 | | | | | 55 | |
| | | | | | | | |
| TTT AGG CGT GAT GCG AAC AAG GCT GAC AAT AAG GCC GCT AGT GTG GCA | 297 | | | | | | |
| Phe Arg Arg Asp Ala Asn Lys Ala Asp Asn Lys Ala Ala Ser Val Ala | | | | | | | |
| | | | | | | 70 | |
| | | | | | | | |
| TTG GAT TCC CTA ATA AAT TTT GAA GCT GTA AAG TAT TTC AAT AAC GAG | 345 | | | | | | |
| Leu Asp Ser Leu Ile Asn Phe Glu Ala Val Lys Tyr Phe Asn Asn Glu | | | | | | | |
| | | | | | | 85 | |
| | | | | | | | |
| AAG TAC CTT GCG GAC AAG TAT CAC ACA TCC TTG ATG AAG TAC CGG GAT | 393 | | | | | | |
| Lys Tyr Leu Ala Asp Lys Tyr His Thr Ser Leu Met Lys Tyr Arg Asp | | | | | | | |
| | | | | | | 100 | |
| | | | | | | | |
| TCC CAG ATA AAG GTC TCG CAA TCG CTG GCG TTT TTG AAC ACC GGC CAG | 441 | | | | | | |
| Ser Gln Ile Lys Val Ser Gln Ser Leu Ala Phe Leu Asn Thr Gly Gln | | | | | | | |
| | | | | | | 115 | |
| | | | | | | | |
| AAC CTA ATT TTT ACC ACT GCA CTG ACT GCA ATG ATG TAT ATG GCC TGT | 489 | | | | | | |
| Asn Leu Ile Phe Thr Thr Ala Leu Thr Ala Met Met Tyr Met Ala Cys | | | | | | | |
| | | | | | | 130 | |
| | | | | | | | |
| AAT GGT GTT ATG CAG GGC TCT CTT ACA GTG GGG GAT CTT GTG TTA ATT | 537 | | | | | | |
| Asn Gly Val Met Gln Gly Ser Leu Thr Val Gly Asp Leu Val Leu Ile | | | | | | | |
| | | | | | | 150 | |
| | | | | | | | |
| AAT CAA CTG GTA TTC CAG CTC TCC GTG CCA CTA AAC TTC CTT GGT AGC | 585 | | | | | | |
| Asn Gln Leu Val Phe Gln Leu Ser Val Pro Leu Asn Phe Leu Gly Ser | | | | | | | |
| | | | | | | 165 | |
| | | | | | | | |

| | | |
|----|---|------|
| | GTC TAC CGT GAT CTC AAG CAG TCT CTG ATA GAT ATG GAA TCT TTA TTT | 633 |
| | Val Tyr Arg Asp Leu Lys Gln Ser Leu Ile Asp Met Glu Ser Leu Phe | |
| | 180 185 190 | |
| 5 | AAA CTG CAA AAA AAT CAG GTC ACA ATT AAG AAC TCC CCA AAT GCC CAG | 681 |
| | Lys Leu Gln Lys Asn Gln Val Thr Ile Lys Asn Ser Pro Asn Ala Gln | |
| | 195 200 205 | |
| 10 | AAC CTA CCA ATA CAC AAA CCG TTG GAT ATT CGC TTT GAA AAT GTT ACG | 729 |
| | Asn Leu Pro Ile His Lys Pro Leu Asp Ile Arg Phe Glu Asn Val Thr | |
| | 210 215 220 225 | |
| 15 | TTT GGC TAT GAC CCG GAG CGG CGT ATA TTG AAC AAT GTT TCG TTT ACC | 777 |
| | Phe Gly Tyr Asp Pro Glu Arg Arg Ile Leu Asn Asn Val Ser Phe Thr | |
| | 230 235 240 | |
| 20 | ATC CCA GCT GGA ATG AAG ACT GCC ATA GTA GGC CCA TCG GGC TCG GGG | 825 |
| | Ile Pro Ala Gly Met Lys Thr Ala Ile Val Gly Pro Ser Gly Ser Gly | |
| | 245 250 255 | |
| 25 | AAG TCC ACC ATT TTG AAG CTC GTA TTT AGA TTC TAT GAG CCC GAG CAA | 873 |
| | Lys Ser Thr Ile Leu Lys Leu Val Phe Arg Phe Tyr Glu Pro Glu Gln | |
| | 260 265 270 | |
| 30 | GGT CGT ATC CTA GTT GGC GGC ACA GAT ATC CGC GAT TTA GAC TTG CTT | 921 |
| | Gly Arg Ile Leu Val Gly Gly Thr Asp Ile Arg Asp Leu Asp Leu Leu | |
| | 275 280 285 | |
| 35 | TCT TTA CGG AAG GCT ATC GGT GTC GTG CCC CAA GAT ACT CCT CTC TTC | 969 |
| | Ser Leu Arg Lys Ala Ile Gly Val Val Pro Gln Asp Thr Pro Leu Phe | |
| | 290 295 300 305 | |
| 40 | AAT GAC ACA ATC TGG GAG AAT GTT AAA TTC GGC AAT ATC AGT TCC TCT | 1017 |
| | Asn Asp Thr Ile Trp Glu Asn Val Lys Phe Gly Asn Ile Ser Ser Ser | |
| | 310 315 320 | |
| 45 | GAC GAT GAG ATT CTC AGG GCC ATA GAA AAA GCT CAA CTC ACG AAG CTA | 1065 |
| | Asp Asp Glu Ile Leu Arg Ala Ile Glu Lys Ala Gln Leu Thr Lys Leu | |
| | 325 330 335 | |
| 50 | CTC CAG AAC CTA CCA AAG GGC GCT TCC ACC GTT GTA GGG GAG CGC GGT | 1113 |
| | Leu Gln Asn Leu Pro Lys Gly Ala Ser Thr Val Val Gly Glu Arg Gly | |
| | 340 345 350 | |
| 55 | TTG ATG ATC AGC GGA GGT GAG AAA CAA AGG CTT GCT ATT GCT CGT GTG | 1161 |
| | Leu Met Ile Ser Gly Gly Glu Lys Gln Arg Leu Ala Ile Ala Arg Val | |
| | 355 360 365 | |
| 60 | CTT TTG AAG GAC GCT CCG CTG ATG TTT TTC GAC GAG GCT ACA AGT GCT | 1209 |
| | Leu Leu Lys Asp Ala Pro Leu Met Phe Phe Asp Glu Ala Thr Ser Ala | |
| | 370 375 380 385 | |

CTG GAT ACA CAC ACA GAG CAG GCA CTC TTG CAC ACC ATT CAG CAG AAC 1257
 Leu Asp Thr His Thr Glu Gln Ala Leu Leu His Thr Ile Gln Gln Asn
 390 395 400

5 TTT TCT TCC AAT TCA AAG ACG AGC GTT TAC GTT GCC CAT AGA CTG CGC 1305
 Phe Ser Ser Asn Ser Lys Thr Ser Val Tyr Val Ala His Arg Leu Arg
 405 410 415

10 ACA ATC GCT GAT GCA GAT AAG ATC ATT GTT CTT GAA CAA GGT TCT GTC 1353
 Thr Ile Ala Asp Ala Asp Lys Ile Ile Val Leu Glu Gln Gly Ser Val
 420 425 430

15 CGC GAA GAG GGC ACA CAC AGC TCG CTG TTA GCG TCA CAA GGA TCC CTA 1401
 Arg Glu Glu Gly Thr His Ser Ser Leu Leu Ala Ser Gln Gly Ser Leu
 435 440 445

20 TAC CGG GGT CTG TGG GAT ATT CAG GAA AAC CTA ACG CTT CCG GAA CGG 1449
 Tyr Arg Gly Leu Trp Asp Ile Gln Glu Asn Leu Thr Leu Pro Glu Arg
 450 455 460 465

CCT GAG CAG TCA ACC GGA TCT CAG CAT GCA TAGACGTCTG ACTAGAGATT 1499
 Pro Glu Gln Ser Thr Gly Ser Gln His Ala
 470 475

25 ATATAATAAC CCTCGAGCCA AAATTATACG GCGCTAACAA GTAAAAATTT TAGTTACTTT 1559
 TCTGACTTCT CTACGCTGAC TTCTCTACCC TTCTAACATA GTTAATTGAA GTAGTGGTTA 1619
 30 ATGACGACTG CATTTTATTA TTGTCCACTT TGCATTAGAA GTACTAGTGC TTAAGCGCTC 1679
 TTTAGGCCGC TTTCTTCTTC TTTGTCAAGC CGCAAGGTAA AGGAAGCACC AACGGATTGC 1739
 TACCGCTGCT ATTCCTGCTC TCTCAAG ATG TGT GGC ATA TTA GGC GTT GTG 1790
 Met Cys Gly Ile Leu Gly Val Val
 35 1 5

CTA GCC GAT CAG TCG AAG GTG GTC GCC CCT GAG TTG TTT GAT GGC TCA 1838
 Leu Ala Asp Gln Ser Lys Val Val Ala Pro Glu Leu Phe Asp Gly Ser
 10 15 20

40 CTG TTC TTA CAG CAT CGC GGT CAA GAT GCT GCC GGG ATT GCT ACG TGC 1886
 Leu Phe Leu Gln His Arg Gly Gln Asp Ala Ala Gly Ile Ala Thr Cys
 25 30 35 40

45 GGC CCC GGT GGG CGC TTG TAC CAA TGT AAG GGC AAT GGT ATG GCA CGG 1934
 Gly Pro Gly Gly Arg Leu Tyr Gln Cys Lys Gly Asn Gly Met Ala Arg
 45 50 55

50 GAC GTG TTC ACG CAA GCT CGG ATG TCA GGG TTG GTT GGC TCT ATG GGG 1982
 Asp Val Phe Thr Gln Ala Arg Met Ser Gly Leu Val Gly Ser Met Gly
 60 65 70

55

| | | |
|----|---|------|
| | ATT GCA CAC CTG AGA TAT CCC ACT GCA GGC TCC AGT GCG AAC TCA GAA | 2030 |
| | Ile Ala His Leu Arg Tyr Pro Thr Ala Gly Ser Ser Ala Asn Ser Glu | |
| | 75 80 85 | |
| 5 | GCG CAG CCA TTC TAT GTG AAT AGT CCC TAC GGA ATT TGC ATG AGT CAT | 2078 |
| | Ala Gln Pro Phe Tyr Val Asn Ser Pro Tyr Gly Ile Cys Met Ser His | |
| | 90 95 100 | |
| 10 | AAT GGT AAT CTG GTG AAC ACG ATG TCT CTA CGT AGA TAT CTT GAT GAA | 2126 |
| | Asn Gly Asn Leu Val Asn Thr Met Ser Leu Arg Arg Tyr Leu Asp Glu | |
| | 105 110 115 120 | |
| 15 | GAC GTT CAC CGT CAT ATT AAC ACG GAC AGC GAT TCT GAG CTA CTG CTT | 2174 |
| | Asp Val His Arg His Ile Asn Thr Asp Ser Asp Ser Glu Leu Leu Leu | |
| | 125 130 135 | |
| 20 | AAT ATA TTT GCC GCG GAG CTG GAA AAG TAC AAC AAA TAT CGT GTG AAC | 2222 |
| | Asn Ile Phe Ala Ala Glu Leu Glu Lys Tyr Asn Lys Tyr Arg Val Asn | |
| | 140 145 150 | |
| 25 | AAC GAT GAT ATA TTT TGT GCT CTA GAG GGT GTT TAC AAA CGT TGT CGC | 2270 |
| | Asn Asp Asp Ile Phe Cys Ala Leu Glu Gly Val Tyr Lys Arg Cys Arg | |
| | 155 160 165 | |
| 30 | GGT GGC TAT GCT TGT GTT GGC ATG TTG GCG GGA TAT GGA TTG TTT GGT | 2318 |
| | Gly Gly Tyr Ala Cys Val Gly Met Leu Ala Gly Tyr Gly Leu Phe Gly | |
| | 170 175 180 | |
| 35 | TTC CGG GAC CCC AAT GGG ATC AGG CCG CTA TTG TTT GGT GAG CGC GTC | 2366 |
| | Phe Arg Asp Pro Asn Gly Ile Arg Pro Leu Leu Phe Gly Glu Arg Val | |
| | 185 190 195 200 | |
| 40 | AAC GAT GAC GGC ACC ATG GAC TAC ATG CTA GCG TCC GAA AGT GTC GTT | 2414 |
| | Asn Asp Asp Gly Thr Met Asp Tyr Met Leu Ala Ser Glu Ser Val Val | |
| | 205 210 215 | |
| 45 | CTT AAG GCC CAC CGC TTC CAA AAC ATA CGT GAT ATT CTT CCC GGC CAA | 2462 |
| | Leu Lys Ala His Arg Phe Gln Asn Ile Arg Asp Ile Leu Pro Gly Gln | |
| | 220 225 230 | |
| 50 | GCC GTC ATT ATC CCT AAA ACG TGC GGC TCC AGT CCA CCA GAG TTC CGG | 2510 |
| | Ala Val Ile Ile Pro Lys Thr Cys Gly Ser Ser Pro Pro Glu Phe Arg | |
| | 235 240 245 | |
| 55 | CAG GTA GTG CCA ATT GAG GCC TAC AAA CCG GAC TTG TTT GAG TAC GTG | 2558 |
| | Gln Val Val Pro Ile Glu Ala Tyr Lys Pro Asp Leu Phe Glu Tyr Val | |
| | 250 255 260 | |
| 60 | TAT TTC GCT CGT GCT GAC AGC GTT CTG GAC GGT ATT TCC GTT TAC CAT | 2606 |
| | Tyr Phe Ala Arg Ala Asp Ser Val Leu Asp Gly Ile Ser Val Tyr His | |
| | 265 270 275 280 | |

| | | |
|----|---|------|
| | ACA CGC CTG TTG ATG GGT ATC AAA CTT GCC GAG AAC ATC AAA AAA CAG | 2654 |
| | Thr Arg Leu Leu Met Gly Ile Lys Leu Ala Glu Asn Ile Lys Lys Gln | |
| | 285 290 295 | |
| 5 | ATC GAT CTG GAC GAA ATT GAC GTT GTT GTA TCT GTT CCT GAC ACT GCA | 2702 |
| | Ile Asp Leu Asp Glu Ile Asp Val Val Val Ser Val Pro Asp Thr Ala | |
| | 300 305 310 | |
| 10 | CGT ACC TGT GCA TTG GAG TGT GCC AAC CAT TTA AAC AAA CCT TAT CGC | 2750 |
| | Arg Thr Cys Ala Leu Glu Cys Ala Asn His Leu Asn Lys Pro Tyr Arg | |
| | 315 320 325 | |
| 15 | GAA GGA TTT GTC AAG AAC AGA TAT GTT GGA AGA ACA TTT ATC ATG CCA | 2798 |
| | Glu Gly Phe Val Lys Asn Arg Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Met Pro | |
| | 330 335 340 | |
| 20 | AAC CAA AAA GAG CGA GTA TCT TCT GTG CGC CGC AAG TTG AAC CCA ATG | 2846 |
| | Asn Gln Lys Glu Arg Val Ser Ser Val Arg Arg Lys Leu Asn Pro Met | |
| | 345 350 355 360 | |
| 25 | AAC TCA GAA TTT AAA GAC AAG CGC GTG CTG ATT GTC GAT GAT TCC ATT | 2894 |
| | Asn Ser Glu Phe Lys Asp Lys Arg Val Leu Ile Val Asp Asp Ser Ile | |
| | 365 370 375 | |
| 30 | GTG CGA GGT ACC ACT TCC AAA GAG ATT GTT AAC ATG GCG AAG GAA TCC | 2942 |
| | Val Arg Gly Thr Thr Ser Lys Glu Ile Val Asn Met Ala Lys Glu Ser | |
| | 380 385 390 | |
| 35 | GGT GCT GCC AAG GTC TAC TTT GCC TCT GCA GCG CCA GCA ATT CGT TTC | 2990 |
| | Gly Ala Ala Lys Val Tyr Phe Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ile Arg Phe | |
| | 395 400 405 | |
| 40 | AAT CAC ATC TAC GGG ATT GAC CTA GCA GAT ACT AAG CAG CTT GTC GCC | 3038 |
| | Asn His Ile Tyr Gly Ile Asp Leu Ala Asp Thr Lys Gln Leu Val Ala | |
| | 410 415 420 | |
| 45 | TAC AAC AGA ACT GTT GAA GAA ATC ACT GCG GAG CTG GGC TGT GAC CGC | 3086 |
| | Tyr Asn Arg Thr Val Glu Glu Ile Thr Ala Glu Leu Gly Cys Asp Arg | |
| | 425 430 435 440 | |
| 50 | GTC ATC TAT CAA TCT TTG GAT GAC CTC ATC GAC TGT TGC AAG ACA GAC | 3134 |
| | Val Ile Tyr Gln Ser Leu Asp Asp Leu Ile Asp Cys Cys Lys Thr Asp | |
| | 445 450 455 | |
| 55 | ATC ATC TCA GAA TTT GAA GTT GGA GTT TTC ACT GGT AAC TAC GTT ACA | 3182 |
| | Ile Ile Ser Glu Phe Glu Val Gly Val Phe Thr Gly Asn Tyr Val Thr | |
| | 460 465 470 | |
| 60 | GGT GTT GAG GAT GTG TAC TTG CAG GAA TTA GAA CGT TGC CGC GCT CTT | 3230 |
| | Gly Val Glu Asp Val Tyr Leu Gln Glu Leu Glu Arg Cys Arg Ala Leu | |
| | 475 480 485 | |

AAT AAC TCG AAT AAG GGT GAA GCG AAG GCC GAG GTT GAT ATT GGT CTC 3278
 Asn Asn Ser Asn Lys Gly Glu Ala Lys Ala Glu Val Asp Ile Gly Leu
 490 495 500

5 TAC AAT TCT GCC GAC TAT TAGCGGCGCC GTTGCCGGCA TCCGGCCCCA 3326
 Tyr Asn Ser Ala Asp Tyr
 505 510

10 TATATAGACT CATCGGGACC TAAAATAAGC CTTTACAGAT CATTATCTAC AAATATAGAT 3386
 ACCATTAAAA GCCTGACTTT CGACTTACTC CTAGCACACC CCGTTGTATC CCTGTGCTTG 3446
 CTTTCTTAAA TGCCGTTGGT TAGGCTTTGG ACTTAGCGTC CCGCCCATTT TCTAGCATGT 3506

15 GCAGATCTAG CAAATTTGGC CTAAGACAAG AAGATCCATT CGGCACCCAC ATCCTGGAGC 3566
 CAGCACACAG TGGACCCAGA C ATG AGC AGC GGC AAT ATA TGG AAG CAA TTG 3617
 Met Ser Ser Gly Asn Ile Trp Lys Gln Leu
 1 5 10

20 CTA GAG GAG AAT AGC GAA CAG CTG GAC CAG TCC ACT ACG GAG ACT TAC 3665
 Leu Glu Glu Asn Ser Glu Gln Leu Asp Gln Ser Thr Thr Glu Thr Tyr
 15 20 25

25 GTG GTA TGC TGC GAG AAC GAA GAT TCC CTT AAC CAG TTT TTG CAA CAA 3713
 Val Val Cys Cys Glu Asn Glu Asp Ser Leu Asn Gln Phe Leu Gln Gln
 30 35 40

30 TGT TGG CAG ATT GAC GAG GGC GAG AAG GTG ACC AAC CTG GAG CCG TTG 3761
 Cys Trp Gln Ile Asp Glu Gly Glu Lys Val Thr Asn Leu Glu Pro Leu
 45 50 55

35 GGA TTC TTT ACA AAG GTG GTT TCG CGC GAC GAA GAG AAC CTC CGG CTC 3809
 Gly Phe Phe Thr Lys Val Val Ser Arg Asp Glu Glu Asn Leu Arg Leu
 60 65 70

40 AAC GTA TAC TAT GCC AAG AGC CCA CTG GAT GCA CAG ACG CTG CAG TTT 3857
 Asn Val Tyr Tyr Ala Lys Ser Pro Leu Asp Ala Gln Thr Leu Gln Phe
 75 80 85 90

CTG GGC GTG TTC CTG CGC CAA ATG GAA ACC TCA CAA ATA CGT TGG ATC 3905
 Leu Gly Val Phe Leu Arg Gln Met Glu Thr Ser Gln Ile Arg Trp Ile
 95 100 105

45 TTC CTA CTG GAC TGG CTG CTA GAC GAT AAA CGA TTA TGG CTA CGT CAA 3953
 Phe Leu Leu Asp Trp Leu Leu Asp Asp Lys Arg Leu Trp Leu Arg Gln
 110 115 120

50 CTG CGG AAC TCG TGG GCC GCC TTG GAG GAA GCG CAG GTG GCA CCC TTT 4001
 Leu Arg Asn Ser Trp Ala Ala Leu Glu Glu Ala Gln Val Ala Pro Phe
 125 130 135

| | | |
|----|---|------|
| | CCA GGT GGC GCT GTG GTG GTG GTC CTC AAC CCG AGT CAC GTG ACA CAA | 4049 |
| | Pro Gly Gly Ala Val Val Val Val Leu Asn Pro Ser His Val Thr Gln | |
| | 140 145 150 | |
| 5 | CTG GAG CGA AAC ACG ATG GTT TGG AAC TCC CGC CGT CTG GAC CTG GTA | 4097 |
| | Leu Glu Arg Asn Thr Met Val Trp Asn Ser Arg Arg Leu Asp Leu Val | |
| | 155 160 165 170 | |
| 10 | CAC CAG ACA CTG CGA GCT GCA TGC CTC AAC ACC GGC TCG GCG CTA GTT | 4145 |
| | His Gln Thr Leu Arg Ala Ala Cys Leu Asn Thr Gly Ser Ala Leu Val | |
| | 175 180 185 | |
| 15 | ACA CTT GAT CCT AAT ACT GCG CGC GAA GAC GTC ATG CAC ATA TGT GCG | 4193 |
| | Thr Leu Asp Pro Asn Thr Ala Arg Glu Asp Val Met His Ile Cys Ala | |
| | 190 195 200 | |
| 20 | CTG CTT GCG GGG CTG CCT ACA TCC CGT CCC GTC GCG ATG CTA AGC CTG | 4241 |
| | Leu Leu Ala Gly Leu Pro Thr Ser Arg Pro Val Ala Met Leu Ser Leu | |
| | 205 210 215 | |
| 25 | CAA AGT CTA TTC ATC CCC CAC GGT GCA GAT TCC ATC GGC AAG ATC TGC | 4289 |
| | Gln Ser Leu Phe Ile Pro His Gly Ala Asp Ser Ile Gly Lys Ile Cys | |
| | 220 225 230 | |
| 30 | ACC ATC GCG CCC GAG TTC CCT GTT GCT ACG GTG TTC GAC AAC GAT TTT | 4337 |
| | Thr Ile Ala Pro Glu Phe Pro Val Ala Thr Val Phe Asp Asn Asp Phe | |
| | 235 240 245 250 | |
| 35 | GTG AGC TCG ACA TTC GAG GCC GCA ATT GCT CCA GAA CTT ACT CCA GGA | 4385 |
| | Val Ser Ser Thr Phe Glu Ala Ala Ile Ala Pro Glu Leu Thr Pro Gly | |
| | 255 260 265 | |
| 40 | CCA CGT GTG CCA TCT GAC CAC CCA TGG CTA ACA GAG CCT ACC AAC CCC | 4433 |
| | Pro Arg Val Pro Ser Asp His Pro Trp Leu Thr Glu Pro Thr Asn Pro | |
| | 270 275 280 | |
| 45 | CCT TCG GAG GCA ACC GCT TGG CAT TTC GAT CTC CAA GGT CGC CTC GCT | 4481 |
| | Pro Ser Glu Ala Thr Ala Trp His Phe Asp Leu Gln Gly Arg Leu Ala | |
| | 285 290 295 | |
| 50 | ACC CTA TAC CGG CAT CTT GGT GAC TCT AAC AAG GCC ATA TCT GTT ACT | 4529 |
| | Thr Leu Tyr Arg His Leu Gly Asp Ser Asn Lys Ala Ile Ser Val Thr | |
| | 300 305 310 | |
| 55 | CAG CAC CGC TTC CAC AAG CCC CGC TCG GAA GAT TAT GCA TAC GAA TTC | 4577 |
| | Gln His Arg Phe His Lys Pro Arg Ser Glu Asp Tyr Ala Tyr Glu Phe | |
| | 315 320 325 330 | |
| 60 | GAG CTG CCG TCT AAG CAC CCT ACA ATA CGT GAC CTC ATA CGC TCT GCC | 4625 |
| | Glu Leu Pro Ser Lys His Pro Thr Ile Arg Asp Leu Ile Arg Ser Ala | |
| | 335 340 345 | |

GCA GCC GAC TCA CCG AAC GAC GTC GCT GAC TCC ATC GAT GGG CTT ATG 4673
 Ala Ala Asp Ser Pro Asn Asp Val Ala Asp Ser Ile Asp Gly Leu Met
 350 355 360
 5 GAT GGT ATC GTA CAA AGG AAT GTT CAT TGACGTCGAC ACAAAAATTT 4720
 Asp Gly Ile Val Gln Arg Asn Val His
 365 370
 10 TGTTACTGTT CTCTCGAGAA CTATTCTCAT CCAGTACTGA CATATTAGAA GGCGAAGTGA 4780
 ACTAGGATTT ATATAAAGTA GCCTTCAGGC AATTGCACAG GGTCTATTGA GTCGCTGCCG 4840
 TTCACGAGAG AGCCCAATAT ATCGAGGACT AATTGGTCAC TTTTGTTTTG CTATACTCAC 4900
 15 CCTGTATTTG CTAATCATTT ATCCGCTTTG TCCAAGTGGT TGCGAAGATA TCGAGCCAGA 4960
 ACATTAGAAT CTGGTTTGCC GCATCCTAGA GCTGTCTCCA AGCCAGTTGA ACCGTTGCCG 5020
 GAGATTACCG CAGCCGGTTT GATCAGAGTA CTGGTGACTG CCAGCACCCA CGTTTGTGAC 5080
 20 TTATAAATAT ACGCCCTGTG GAGCCATAGC CATTGGCATA AAGAGAAGAG CACCCCGTGC 5140
 CACGATGCAG ACACTTCCGG TGTACCCAGC GTCACAGACT GCGTCGCCTA CGAAGCGTGA 5200
 ACTTGCAGCG GCGCCCTCGG TGCCGCAGGA CGGCGCCCGG CTGCCTGCGC AGCTCACTTT 5260
 25 AGTGACGCCC CCAGAACCTG ATATCCAGAA GAAGTCAGTG CGATCTCAGG TCGCGCGTTT 5320
 AAGCATCTCG GAGACAGATG TAGTGAAGAG TGATATCGTG GCTAAGCTT 5369

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 475 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

40 Met Asp Arg Gly Cys Lys Gly Ile Ser Tyr Val Leu Ser Ala Met Val
 1 5 10 15
 Phe His Ile Ile Pro Ile Thr Phe Glu Ile Ser Met Val Cys Gly Ile
 20 25 30
 45 Leu Thr Tyr Gln Phe Gly Ala Ser Phe Ala Ala Ile Thr Phe Ser Thr
 35 40 45
 Met Leu Leu Tyr Ser Ile Phe Thr Phe Arg Thr Thr Ala Trp Arg Thr
 50 55 60
 55 Arg Phe Arg Arg Asp Ala Asn Lys Ala Asp Asn Lys Ala Ala Ser Val
 65 70 75 80

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Ala | Leu | Asp | Ser | Leu | Ile | Asn | Phe | Glu | Ala | Val | Lys | Tyr | Phe | Asn | Asn | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| 5 | Glu | Lys | Tyr | Leu | Ala | Asp | Lys | Tyr | His | Thr | Ser | Leu | Met | Lys | Tyr | Arg | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| | Asp | Ser | Gln | Ile | Lys | Val | Ser | Gln | Ser | Leu | Ala | Phe | Leu | Asn | Thr | Gly | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| 10 | Gln | Asn | Leu | Ile | Phe | Thr | Thr | Ala | Leu | Thr | Ala | Met | Met | Tyr | Met | Ala | |
| | | 130 | | | | | | 135 | | | | 140 | | | | | |
| | Cys | Asn | Gly | Val | Met | Gln | Gly | Ser | Leu | Thr | Val | Gly | Asp | Leu | Val | Leu | |
| 15 | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| | Ile | Asn | Gln | Leu | Val | Phe | Gln | Leu | Ser | Val | Pro | Leu | Asn | Phe | Leu | Gly | |
| | | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| | Ser | Val | Tyr | Arg | Asp | Leu | Lys | Gln | Ser | Leu | Ile | Asp | Met | Glu | Ser | Leu | |
| 20 | | | | 180 | | | | | | 185 | | | | 190 | | | |
| | Phe | Lys | Leu | Gln | Lys | Asn | Gln | Val | Thr | Ile | Lys | Asn | Ser | Pro | Asn | Ala | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| 25 | Gln | Asn | Leu | Pro | Ile | His | Lys | Pro | Leu | Asp | Ile | Arg | Phe | Glu | Asn | Val | |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | Thr | Phe | Gly | Tyr | Asp | Pro | Glu | Arg | Arg | Ile | Leu | Asn | Asn | Val | Ser | Phe | |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| 30 | Thr | Ile | Pro | Ala | Gly | Met | Lys | Thr | Ala | Ile | Val | Gly | Pro | Ser | Gly | Ser | |
| | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| | Gly | Lys | Ser | Thr | Ile | Leu | Lys | Leu | Val | Phe | Arg | Phe | Tyr | Glu | Pro | Glu | |
| 35 | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| | Gln | Gly | Arg | Ile | Leu | Val | Gly | Gly | Thr | Asp | Ile | Arg | Asp | Leu | Asp | Leu | |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| | Leu | Ser | Leu | Arg | Lys | Ala | Ile | Gly | Val | Val | Pro | Gln | Asp | Thr | Pro | Leu | |
| 40 | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| | Phe | Asn | Asp | Thr | Ile | Trp | Glu | Asn | Val | Lys | Phe | Gly | Asn | Ile | Ser | Ser | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| 45 | Ser | Asp | Asp | Glu | Ile | Leu | Arg | Ala | Ile | Glu | Lys | Ala | Gln | Leu | Thr | Lys | |
| | | | | 325 | | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| | Leu | Leu | Gln | Asn | Leu | Pro | Lys | Gly | Ala | Ser | Thr | Val | Val | Gly | Glu | Arg | |
| | | | 340 | | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| 50 | Gly | Leu | Met | Ile | Ser | Gly | Gly | Glu | Lys | Gln | Arg | Leu | Ala | Ile | Ala | Arg | |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |

55

Val Leu Leu Lys Asp Ala Pro Leu Met Phe Phe Asp Glu Ala Thr Ser
370 375 380

5 Ala Leu Asp Thr His Thr Glu Gln Ala Leu Leu His Thr Ile Gln Gln
385 390 395 400

Asn Phe Ser Ser Asn Ser Lys Thr Ser Val Tyr Val Ala His Arg Leu
405 410 415

10 Arg Thr Ile Ala Asp Ala Asp Lys Ile Ile Val Leu Glu Gln Gly Ser
420 425 430

Val Arg Glu Glu Gly Thr His Ser Ser Leu Leu Ala Ser Gln Gly Ser
15 435 440 445

Leu Tyr Arg Gly Leu Trp Asp Ile Gln Glu Asn Leu Thr Leu Pro Glu
450 455 460

20 Arg Pro Glu Gln Ser Thr Gly Ser Gln His Ala
465 470 475

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

25 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 510 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Cys Gly Ile Leu Gly Val Val Leu Ala Asp Gln Ser Lys Val Val
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Phe Asp Gly Ser Leu Phe Leu Gln His Arg Gly Gln
20 25 30

40 Asp Ala Ala Gly Ile Ala Thr Cys Gly Pro Gly Gly Arg Leu Tyr Gln
35 40 45

Cys Lys Gly Asn Gly Met Ala Arg Asp Val Phe Thr Gln Ala Arg Met
50 55 60

45 Ser Gly Leu Val Gly Ser Met Gly Ile Ala His Leu Arg Tyr Pro Thr
65 70 75 80

Ala Gly Ser Ser Ala Asn Ser Glu Ala Gln Pro Phe Tyr Val Asn Ser
85 90 95

50 Pro Tyr Gly Ile Cys Met Ser His Asn Gly Asn Leu Val Asn Thr Met
100 105 110

55

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Ser | Leu | Arg | Arg | Tyr | Leu | Asp | Glu | Asp | Val | His | Arg | His | Ile | Asn | Thr | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Asp | Ser | Asp | Ser | Glu | Leu | Leu | Leu | Asn | Ile | Phe | Ala | Ala | Glu | Leu | Glu | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Lys | Tyr | Asn | Lys | Tyr | Arg | Val | Asn | Asn | Asp | Asp | Ile | Phe | Cys | Ala | Leu | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | Glu | Gly | Val | Tyr | Lys | Arg | Cys | Arg | Gly | Gly | Tyr | Ala | Cys | Val | Gly | Met | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | Leu | Ala | Gly | Tyr | Gly | Leu | Phe | Gly | Phe | Arg | Asp | Pro | Asn | Gly | Ile | Arg | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Pro | Leu | Leu | Phe | Gly | Glu | Arg | Val | Asn | Asp | Asp | Gly | Thr | Met | Asp | Tyr | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | Met | Leu | Ala | Ser | Glu | Ser | Val | Val | Leu | Lys | Ala | His | Arg | Phe | Gln | Asn | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Ile | Arg | Asp | Ile | Leu | Pro | Gly | Gln | Ala | Val | Ile | Ile | Pro | Lys | Thr | Cys | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | Gly | Ser | Ser | Pro | Pro | Glu | Phe | Arg | Gln | Val | Val | Pro | Ile | Glu | Ala | Tyr | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Lys | Pro | Asp | Leu | Phe | Glu | Tyr | Val | Tyr | Phe | Ala | Arg | Ala | Asp | Ser | Val | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | Leu | Asp | Gly | Ile | Ser | Val | Tyr | His | Thr | Arg | Leu | Leu | Met | Gly | Ile | Lys | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Leu | Ala | Glu | Asn | Ile | Lys | Lys | Gln | Ile | Asp | Leu | Asp | Glu | Ile | Asp | Val | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Val | Val | Ser | Val | Pro | Asp | Thr | Ala | Arg | Thr | Cys | Ala | Leu | Glu | Cys | Ala | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | Asn | His | Leu | Asn | Lys | Pro | Tyr | Arg | Glu | Gly | Phe | Val | Lys | Asn | Arg | Tyr | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Val | Gly | Arg | Thr | Phe | Ile | Met | Pro | Asn | Gln | Lys | Glu | Arg | Val | Ser | Ser | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | Val | Arg | Arg | Lys | Leu | Asn | Pro | Met | Asn | Ser | Glu | Phe | Lys | Asp | Lys | Arg | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Val | Leu | Ile | Val | Asp | Asp | Ser | Ile | Val | Arg | Gly | Thr | Thr | Ser | Lys | Glu | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | Ile | Val | Asn | Met | Ala | Lys | Glu | Ser | Gly | Ala | Ala | Lys | Val | Tyr | Phe | Ala | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

5 Ala Asp Thr Lys Gln Leu Val Ala Tyr Asn Arg Thr Val Glu Glu Ile
 420 425 430

10 Leu Ile Asp Cys Cys Lys Thr Asp Ile Ile Ser Glu Phe Glu Val Gly
450 455 460

15 465 470 475 480

Lys Ala Glu Val Asp Ile Gly Leu Tyr Asn Ser Ala Asp Tyr
500 505 510

25 (1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 371 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

| | 1 | 5 | 10 | 15 |
|----|---|---|----|----|
| 25 | | | | |

Gln Leu Asp Gln Ser Thr Thr Glu Thr Tyr Val Val Cys Cys Glu Asn
20 25 30

40 35 40 45

45 Val Ser Arg Asp Glu Glu Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Tyr Ala Lys
65 70 75 80

Leu Asp Asp Lys Arg Leu Trp Leu Arg Gln Leu Arg Asn Ser Trp Ala
 115 120 125
 5 Ala Leu Glu Glu Ala Gln Val Ala Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val Val
 130 135 140
 Val Val Leu Asn Pro Ser His Val Thr Gln Leu Glu Arg Asn Thr Met
 145 150 155 160
 10 Val Trp Asn Ser Arg Arg Leu Asp Leu Val His Gln Thr Leu Arg Ala
 165 170 175
 Ala Cys Leu Asn Thr Gly Ser Ala Leu Val Thr Leu Asp Pro Asn Thr
 15 180 185 190
 Ala Arg Glu Asp Val Met His Ile Cys Ala Leu Leu Ala Gly Leu Pro
 195 200 205
 20 Thr Ser Arg Pro Val Ala Met Leu Ser Leu Gln Ser Leu Phe Ile Pro
 210 215 220
 His Gly Ala Asp Ser Ile Gly Lys Ile Cys Thr Ile Ala Pro Glu Phe
 225 230 235 240
 25 Pro Val Ala Thr Val Phe Asp Asn Asp Phe Val Ser Ser Thr Phe Glu
 245 250 255
 Ala Ala Ile Ala Pro Glu Leu Thr Pro Gly Pro Arg Val Pro Ser Asp
 30 260 265 270
 His Pro Trp Leu Thr Glu Pro Thr Asn Pro Pro Ser Glu Ala Thr Ala
 275 280 285
 35 Trp His Phe Asp Leu Gln Gly Arg Leu Ala Thr Leu Tyr Arg His Leu
 290 295 300
 Gly Asp Ser Asn Lys Ala Ile Ser Val Thr Gln His Arg Phe His Lys
 305 310 315 320
 40 Pro Arg Ser Glu Asp Tyr Ala Tyr Glu Phe Glu Leu Pro Ser Lys His
 325 330 335
 Pro Thr Ile Arg Asp Leu Ile Arg Ser Ala Ala Ala Asp Ser Pro Asn
 45 340 345 350
 Asp Val Ala Asp Ser Ile Asp Gly Leu Met Asp Gly Ile Val Gln Arg
 355 360 365
 50 Asn Val His
 370

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

55

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 3616 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

(B) LAGE: 1..863

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 864..1316

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: intron

(B) LAGE: 1317..1477

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1478..2592

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 2593..3616

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

| | |
|--|-----|
| GGGCCCCGGTG CCAGCTCGCC AGGTGCGGAC TCGCGCTCGG GCTGTGGGCG CTCTACCTGC | 60 |
| TGCTGCTCGG CAGCTGCCTG ACGCGCGCGT ACGAGCTGTC GGATCTCGAA AACCTGGAAT | 120 |
| CCGATTACTA CAGCTACGTG CTGGATGTGA ACTTCGCGCT GCTGAGCGCC ATGAGCGCGA | 180 |
| CCGGCCCTCGC GATGGGCGCC GTGAGCGGCT CCCTCGGGAG CGCGCCGGTG CTCGCGCAGT | 240 |
| GGCCGGCAGC GATCTGGGCC GTGCGCTTCC TGCGCGCCGC GGGCTATGTC GCGATAGTCC | 300 |
| TAATCCTGCC GTTCCTGTCC GTCGTCGCAT TCCTGCAGCC GCTCTGCGAG CGCGCGCTGG | 360 |
| CGCTGTTCCC GTTTGTGCGC GCGTGGGGCA TGGACGGCGT GTTCAACTTC CTGCTGCTCT | 420 |
| CCGCCGTGCT CTGGACTGTA TTCCTGGCCG TTCGCCTGCT CCGCGCCGTC TACAGACTGC | 480 |
| TGCGCTGGCT GGTGCGTCTT TTGGTCCGCC TGGCAGGCCT GCTGCTGCGA GGCGCCCGTC | 540 |
| GGACGCCTGC GGCGGCCCCG GAGGAGCCCC TCTAGCGTGC GCGCGTTCTA GGCCCCCTGAC | 600 |
| AGCTCCTACC TGGTGCTGGC CGCCGGTAGG GCTCGCATCG TGCGGCGCAG GCCCATTTGCT | 660 |

TTTTGGCCCC CGCTGGATCA TCGTTTCTTT TACGTGAAAA GTTTCAGCG ATGAGCTGCA 720
 GTATAAATAG GTTTTCTAGA TCGCCAAAT CCCAGCTGGG TTTACCGGCG TCTGTTCTGGG 780
 5 ATAGTTACTT GATGGATGGG TCAACTTGAG AGCTTGGGTT TAGTGTGAC TCCTTCTCTT 840
 CATAGCACGC CGAACAAAGC GCA ATG ACT TAC AGA GAC GCA GCC ACG GCA 890
 Met Thr Tyr Arg Asp Ala Ala Thr Ala
 1 5
 10 CTG GAG CAC CTG GCG ACG TAC GCC GAG AAG GAC GGG CTG TCC GTG GAG 938
 Leu Glu His Leu Ala Thr Tyr Ala Glu Lys Asp Gly Leu Ser Val Glu
 10 15 20 25
 15 CAG TTG ATG GAC TCC AAG ACG CGG GGC GGG TTG ACG TAC AAC GAC TTC 986
 Gln Leu Met Asp Ser Lys Thr Arg Gly Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe
 30 35 40
 20 CTG GTC TTG CCG GGC AAG ATC GAC TTC CCA TCG TCG GAG GTG GTG CTG 1034
 Leu Val Leu Pro Gly Lys Ile Asp Phe Pro Ser Ser Glu Val Val Leu
 45 50 55
 25 TCG TCG CGC CTG ACC AAG AAG ATC ACC TTG AAC GCG CCG TTT GTG TCG 1082
 Ser Ser Arg Leu Thr Lys Lys Ile Thr Leu Asn Ala Pro Phe Val Ser
 60 65 70
 30 TCG CCG ATG GAC ACG GTG ACG GAG GCC GAC ATG GCG ATC CAC ATG GCG 1130
 Ser Pro Met Asp Thr Val Thr Glu Ala Asp Met Ala Ile His Met Ala
 75 80 85
 35 CTC CTG GGC GGC ATC GGG ATC ATC CAC CAC AAC TGC ACT GCG GAG GAG 1178
 Leu Leu Gly Gly Ile Gly Ile Ile His His Asn Cys Thr Ala Glu Glu
 90 95 100 105
 40 CAG GCG GAG ATG GTG CGC CGG GTC AAG AAG TAC GAA AAC GGG TTC ATC 1226
 Gln Ala Glu Met Val Arg Arg Val Lys Lys Tyr Glu Asn Gly Phe Ile
 110 115 120
 45 AAC GCC CCC GTG GTC GTG GGG CCG GAC GCG ACG GTG GCG GAC GTG CGC 1274
 Asn Ala Pro Val Val Val Gly Pro Asp Ala Thr Val Ala Asp Val Arg
 125 130 135
 50 CGG ATG AAG AAC GAG TTT GGG TTT GCA GGA TTT CCT GTG ACA 1316
 Arg Met Lys Asn Glu Phe Gly Phe Ala Gly Phe Pro Val Thr
 140 145 150
 55 GGTATGTTAG AGTGGCACGC GGGGCTGCAC GCTGGGATGA TGATCATAAA TCAATAACTT 1376
 TCGTTCTACT GACTGCGATC AAACGATCGT GTAGACACCT TTTACTCTGA CCGCAGACGT 1436
 GCAGCGCCTT TTTGGCAGGA ACATGTACTA ACACATCAGC A GAT GAT GGC AAG 1489
 Asp Asp Gly Lys
 1

| | | |
|----|---|------|
| | CCG ACC GGG AAG CTG CAG GGG ATC ATC ACG TCC CGT GAC ATC CAG TTT | 1537 |
| | Pro Thr Gly Lys Leu Gln Gly Ile Ile Thr Ser Arg Asp Ile Gln Phe | |
| | 5 10 15 20 | |
| 5 | GTC GAG GAC GAG ACC CTG CTT GTG TCT GAG ATC ATG ACC AAG GAC GTC | 1585 |
| | Val Glu Asp Glu Thr Leu Leu Val Ser Glu Ile Met Thr Lys Asp Val | |
| | 25 30 35 | |
| 10 | ATC ACT GGG AAG CAG GGC ATC AAC CTC GAG GAG GCG AAC CAG ATC CTG | 1633 |
| | Ile Thr Gly Lys Gln Gly Ile Asn Leu Glu Glu Ala Asn Gln Ile Leu | |
| | 40 45 50 | |
| 15 | AAG AAC ACC AAG AAG GGC AAG CTG CCA ATT GTG GAC GAG GCG GGC TGC | 1681 |
| | Lys Asn Thr Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asp Glu Ala Gly Cys | |
| | 55 60 65 | |
| 20 | CTG GTG TCC ATG CTT TCG AGA ACT GAC TTG ATG AAG AAC CAG TCC TAC | 1729 |
| | Leu Val Ser Met Leu Ser Arg Thr Asp Leu Met Lys Asn Gln Ser Tyr | |
| | 70 75 80 | |
| 25 | CCA TTG GCC TCC AAG TCT GCC GAC ACC AAG CAG CTG CTC TGT GGT GCT | 1777 |
| | Pro Leu Ala Ser Lys Ser Ala Asp Thr Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala | |
| | 85 90 95 100 | |
| 30 | GCG ATC GGC ACC ATC GAC GCG GAC AGG CAG AGA CTG GCG ATG CTG GTC | 1825 |
| | Ala Ile Gly Thr Ile Asp Ala Asp Arg Gln Arg Leu Ala Met Leu Val | |
| | 105 110 115 | |
| 35 | GAG GCC GGT CTG GAC GTT GTT GTG CTA GAC TCC TCG CAG GGT AAC TCG | 1873 |
| | Glu Ala Gly Leu Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser | |
| | 120 125 130 | |
| 40 | GTC TTC CAG ATC AAC ATG ATC AAG TGG ATC AAG GAG ACC TTC CCA GAC | 1921 |
| | Val Phe Gln Ile Asn Met Ile Lys Trp Ile Lys Glu Thr Phe Pro Asp | |
| | 135 140 145 | |
| 45 | CTG CAG GTC ATT GCT GGC AAC GTG GTC ACC AGA GAG CAG GCT GCC AGC | 1969 |
| | Leu Gln Val Ile Ala Gly Asn Val Val Thr Arg Glu Gln Ala Ala Ser | |
| | 150 155 160 | |
| 50 | TTG ATC CAC GCC GGC GCA GAC GGG TTG CGT ATC GGT ATG GGC TCT GGC | 2017 |
| | Leu Ile His Ala Gly Ala Asp Gly Leu Arg Ile Gly Met Gly Ser Gly | |
| | 165 170 175 180 | |
| 55 | TCC ATC TGT ATC ACT CAG GAG GTG ATG GCC TGT GGT AGA CCA CAG GGT | 2065 |
| | Ser Ile Cys Ile Thr Gln Glu Val Met Ala Cys Gly Arg Pro Gln Gly | |
| | 185 190 195 | |
| 60 | ACC GCT GTC TAC AAC GTC ACG CAG TTC GCC AAC CAG TTT GGT GTG CCA | 2113 |
| | Thr Ala Val Tyr Asn Val Thr Gln Phe Ala Asn Gln Phe Gly Val Pro | |
| | 200 205 210 | |

TGT ATT GCT GAC GGT GGT GTC CAG AAC ATC GGG CAC ATT ACC AAA GCT 2161
 Cys Ile Ala Asp Gly Gly Val Gln Asn Ile Gly His Ile Thr Lys Ala
 215 220 225

5 ATC GCT CTT GGC GCG TCC ACC GTC ATG ATG GGC GGT ATG CTG GCA GGC 2209
 Ile Ala Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Gly Met Leu Ala Gly
 230 235 240

10 ACT ACA GAG TCT CCA GGC GAG TAC TTC TTC AGG GAC GGG AAG AGA CTG 2257
 Thr Thr Glu Ser Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Arg Asp Gly Lys Arg Leu
 245 250 255 260

15 AAG ACC TAC AGA GGT ATG GGC TCC ATC GAC GCC ATG CAA AAG ACT GAT 2305
 Lys Thr Tyr Arg Gly Met Gly Ser Ile Asp Ala Met Gln Lys Thr Asp
 265 270 275

20 GTC AAG GGT AAC GCC GCT ACC TCC CGT TAC TTC TCT GAG TCT GAC AAG 2353
 Val Lys Gly Asn Ala Ala Thr Ser Arg Tyr Phe Ser Glu Ser Asp Lys
 280 285 290

GTT CTG GTC GCT CAG GGT GTT ACT GGT TCT GTG ATC GAC AAG GGC TCC 2401
 Val Leu Val Ala Gln Gly Val Thr Gly Ser Val Ile Asp Lys Gly Ser
 295 300 305

25 ATC AAG AAG TAC ATT CCA TAT CTG TAC AAT GGT CTA CAG CAC TCG TGC 2449
 Ile Lys Lys Tyr Ile Pro Tyr Leu Tyr Asn Gly Leu Gln His Ser Cys
 310 315 320

30 CAG GAT ATC GGT GTG CGC TCT CTA GTG GAG TTC AGA GAG AAG GTG GAC 2497
 Gln Asp Ile Gly Val Arg Ser Leu Val Glu Phe Arg Glu Lys Val Asp
 325 330 335 340

35 TCT GGC TCG GTC AGA TTT GAG TTC AGA ACT CCA TCT GCC CAG TTG GAG 2545
 Ser Gly Ser Val Arg Phe Glu Phe Arg Thr Pro Ser Ala Gln Leu Glu
 345 350 355

GGT GGT GTG CAC AAC TTG CAC TCC TAC GAG AAG CGC CTA TTT GACTGAGTGC 2597
 Gly Gly Val His Asn Leu His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe Asp
 360 365 370

40 CACTAGGCC ACACTATAGA AGTGGATCCG GGCGCGATGG CACCCATACT TTTATATTAT 2657
 GTTGATTGAT GTACGTAAAC GATAGATATA ATAACAGACG CGGCATCTCA TTTGTATGCA 2717
 ATATATCTGG AACATGGTTA TGCCTACTCA ACTGTATGTA CTACTTTATA TACACAGCTC 2777

45 TGGGACACTT GGTGAGATAT ATGTTTCATT ATGTATGCCT CGCTATCGAA AGGTCTGGCA 2837
 TTATGGGCTA CTGGGTCTAA GAGTCATGGC TTATGAGTAT TTATTTATTT ATTTCTCTTC 2897

50 CTTTTCATTA AACTCCTCGA GCTTCTTTCT GTAATACTGC TCTCTAGACT TCTCCACATC 2957
 TGCTAATGAT GGTGGAAGTC GTTCGTTTTT CAAATCCGCT CTACGAGCGC GCTCGAAGTT 3017

55

AGACAGCGCC TCGTTCAGAC CTTCAGACCC GCGTGACAGC GCTCCACGAG GCAGCACGCC 3077
 AGAATTCATT GTTTTATAGGT ACTGCACCTT ATCGCTCTCT TCTCTCAACA CGCTATACAT 3137
 5 TCGGGAAACC TTGGCAATCG CCAATATTTT ACTGCGTAGT GCACGCCGTT TTGCATCATC 3197
 GTCCAGAATA GACCGTTTTT TCTTCGATTT CTTGGAGCCA GGTATAACAG TTACAACCTG 3257
 CTCAGTGTTC TTGGACTTCA ATGTAGCACC TAAGTCCTCC CTTATAACAA AAGTCTCTTC 3317
 10 CTCCAATTCT TCTTCAGTAC AAATGTTTAA TATCGAAACC AACATTTTCAG TCACTTTCTC 3377
 GCCAACAAAT GGCAAAGACC AGGTGAATAC GTCCATGAAA TTCGGTAACC AATACGGATG 3437
 CTGTGACATG TTAAATTGTC TAATGTTTCAT AACGTTATCC GAGTATTTTA GGACCGCGGC 3497
 15 CTTGTTCTTG TAAGTGTCCA AGTAGTTGGG TCGCTGAAC AACGTAAGTA AACTAGGAAA 3557
 GCCCAGATTC TTGGTATTCT TGTACATTCT GTAGCCCTGA TCTTGGGCTT CGTGGGCCC 3616

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 151 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

30 Met Thr Tyr Arg Asp Ala Ala Thr Ala Leu Glu His Leu Ala Thr Tyr
 1 5 10 15
 Ala Glu Lys Asp Gly Leu Ser Val Glu Gln Leu Met Asp Ser Lys Thr
 20 25 30
 35 Arg Gly Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Val Leu Pro Gly Lys Ile
 35 40 45
 Asp Phe Pro Ser Ser Glu Val Val Leu Ser Ser Arg Leu Thr Lys Lys
 40 50 55 60
 Ile Thr Leu Asn Ala Pro Phe Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr
 65 70 75 80
 45 Glu Ala Asp Met Ala Ile His Met Ala Leu Leu Gly Gly Ile Gly Ile
 85 90 95
 Ile His His Asn Cys Thr Ala Glu Glu Gln Ala Glu Met Val Arg Arg
 100 105 110
 50 Val Lys Lys Tyr Glu Asn Gly Phe Ile Asn Ala Pro Val Val Val Gly
 115 120 125

Pro Asp Ala Thr Val Ala Asp Val Arg Arg Met Lys Asn Glu Phe Gly
 130 135 140

Phe Ala Gly Phe Pro Val Thr
 145 150

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 371 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Asp Asp Gly Lys Pro Thr Gly Lys Leu Gln Gly Ile Ile Thr Ser Arg
 1 5 10 15

Asp Ile Gln Phe Val Glu Asp Glu Thr Leu Leu Val Ser Glu Ile Met
 20 25 30

Thr Lys Asp Val Ile Thr Gly Lys Gln Gly Ile Asn Leu Glu Glu Ala
 35 40 45

Asn Gln Ile Leu Lys Asn Thr Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asp
 50 55 60

Glu Ala Gly Cys Leu Val Ser Met Leu Ser Arg Thr Asp Leu Met Lys
 65 70 75 80

Asn Gln Ser Tyr Pro Leu Ala Ser Lys Ser Ala Asp Thr Lys Gln Leu
 85 90 95

Leu Cys Gly Ala Ala Ile Gly Thr Ile Asp Ala Asp Arg Gln Arg Leu
 100 105 110

Ala Met Leu Val Glu Ala Gly Leu Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser
 115 120 125

Gln Gly Asn Ser Val Phe Gln Ile Asn Met Ile Lys Trp Ile Lys Glu
 130 135 140

Thr Phe Pro Asp Leu Gln Val Ile Ala Gly Asn Val Val Thr Arg Glu
 145 150 155 160

Gln Ala Ala Ser Leu Ile His Ala Gly Ala Asp Gly Leu Arg Ile Gly
 165 170 175

Met Gly Ser Gly Ser Ile Cys Ile Thr Gln Glu Val Met Ala Cys Gly
 180 185 190

Arg Pro Gln Gly Thr Ala Val Tyr Asn Val Thr Gln Phe Ala Asn Gln
 195 200 205
 5 Phe Gly Val Pro Cys Ile Ala Asp Gly Gly Val Gln Asn Ile Gly His
 210 215 220
 Ile Thr Lys Ala Ile Ala Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Gly
 225 230 235 240
 10 Met Leu Ala Gly Thr Thr Glu Ser Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Arg Asp
 245 250 255
 Gly Lys Arg Leu Lys Thr Tyr Arg Gly Met Gly Ser Ile Asp Ala Met
 15 260 265 270
 Gln Lys Thr Asp Val Lys Gly Asn Ala Ala Thr Ser Arg Tyr Phe Ser
 275 280 285
 20 Glu Ser Asp Lys Val Leu Val Ala Gln Gly Val Thr Gly Ser Val Ile
 290 295 300
 Asp Lys Gly Ser Ile Lys Lys Tyr Ile Pro Tyr Leu Tyr Asn Gly Leu
 305 310 315 320
 25 Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Val Arg Ser Leu Val Glu Phe Arg
 325 330 335
 Glu Lys Val Asp Ser Gly Ser Val Arg Phe Glu Phe Arg Thr Pro Ser
 340 345 350
 30 Ala Gln Leu Glu Gly Gly Val His Asn Leu His Ser Tyr Glu Lys Arg
 355 360 365
 Leu Phe Asp
 35 370

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2697 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
 (B) LAGE: 1..455

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 456..2033

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 2034..2697

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-----|
| ATCGATTTCA | GGAGATTTTT | GGTAGCATTA | TTGAGGTCAT | TAGAGGCGTT | CTGTGACTTT | 60 |
| CGACGATTTG | CACGCGCAGA | AGAGGGCGTT | CAACCAGCCT | TTCGGATATT | CCGGTTCGAG | 120 |
| TTATACCAGC | AGGGATCAGC | GCAGGCACTA | GAGTGGCGGG | TGCTAATAAG | AGGAGCAGGT | 180 |
| CCTGGAAC TG | AAGTTGCAAG | AGATAAGCAT | TGCGCGGAGA | AGGAGGCGGT | TAGAGGGTGC | 240 |
| AAGCGAGCAG | GATGGGGTCT | TCGATGAACT | TCCCGTCTGG | GTATGTGAAC | AAGCACACGC | 300 |
| TGCAGGCACA | CCGGTAGGGC | GAGTGCAGGG | TGAAAAATAT | ATATGCGCTC | GAGAAGCGCT | 360 |
| GGGGATGAGT | TCGTCTGCAA | CGGCAGGCGG | ATCTTCATCT | GACAAAACCA | GCTGCCTACA | 420 |
| TCAGTGC GAA | GCTGTT CAGT | GATAGAATAG | GAGTA ATG | GCT GCT | GTT GAA CAA | 473 |
| | | | Met | Ala | Ala Val Glu Gln | |
| | | | 1 | | 5 | |
| GTT TCT AGC | GTG TTT GAC | ACC ATT TTG | GTG CTG GAC | TTC GGG TCC | CAG | 521 |
| Val Ser Ser | Val Phe Asp | Thr Ile Leu | Val Leu Asp | Phe Gly Ser | Gln | |
| | 10 | 15 | | 20 | | |
| TAC TCG CAT | CTG ATC ACG | CGG CGG CTG | CGT GAG TTT | AAT GTG TAC | GCG | 569 |
| Tyr Ser His | Leu Ile Thr | Arg Arg Leu | Arg Glu Phe | Asn Val Tyr | Ala | |
| | 25 | 30 | | 35 | | |
| GAG ATG CTT | CCG TGT ACG | CAG AAG ATC | AGC GAG CTG | GGC TGG AAG | CCA | 617 |
| Glu Met Leu | Pro Cys Thr | Gln Lys Ile | Ser Glu Leu | Gly Trp Lys | Pro | |
| | 40 | 45 | | 50 | | |
| AAG GGT GTG | ATT TTG TCA | GGC GGG CCG | TAC TCC GTG | TAC GCG GCA | GAT | 665 |
| Lys Gly Val | Ile Leu Ser | Gly Gly Pro | Tyr Ser Val | Tyr Ala Ala | Asp | |
| | 55 | 60 | | 65 | 70 | |
| GCT CCG CAC | GTG GAC CGG | GCG GTG TTC | GAG TTG GGC | GTT CCA ATT | CTG | 713 |
| Ala Pro His | Val Asp Arg | Ala Val Phe | Glu Leu Gly | Val Pro Ile | Leu | |
| | 75 | 80 | | 85 | | |
| GGC ATC TGC | TAC GGG CTA | CAG GAG CTT | GCG TGG ATA | GCC GGC GCA | GAG | 761 |
| Gly Ile Cys | Tyr Gly Leu | Gln Glu Leu | Ala Trp Ile | Ala Gly Ala | Glu | |
| | 90 | 95 | | 100 | | |

| | | |
|----|---|------|
| | GTG GGG CGC GGC GAG AAG CGC GAG TAC GGG CGC GCG ACG CTG CAC GTG | 809 |
| | Val Gly Arg Gly Glu Lys Arg Glu Tyr Gly Arg Ala Thr Leu His Val | |
| | 105 110 115 | |
| 5 | GAG GAC AGC GCG TGC CCG CTG TTC AAC AAC GTG GAC AGC AGC ACG GTG | 857 |
| | Glu Asp Ser Ala Cys Pro Leu Phe Asn Asn Val Asp Ser Ser Thr Val | |
| | 120 125 130 | |
| 10 | TGG ATG TCG CAC GGT GAC AAG CTG CAC GCA CTA CCT GCG GAT TTC CAC | 905 |
| | Trp Met Ser His Gly Asp Lys Leu His Ala Leu Pro Ala Asp Phe His | |
| | 135 140 145 150 | |
| 15 | GTC ACT GCG ACG ACG GAG AAC TCT CCT TTC TGC GGG ATT GCA CAC GAC | 953 |
| | Val Thr Ala Thr Thr Glu Asn Ser Pro Phe Cys Gly Ile Ala His Asp | |
| | 155 160 165 | |
| 20 | TCG AAG CCA ATC TTC GGG ATC CAG TTC CAC CCT GAG GTG ACG CAC TCC | 1001 |
| | Ser Lys Pro Ile Phe Gly Ile Gln Phe His Pro Glu Val Thr His Ser | |
| | 170 175 180 | |
| 25 | TCG CAG GGG AAG ACG TTG CTG AAG AAC TTT GCG GTG GAG ATC TGC CAG | 1049 |
| | Ser Gln Gly Lys Thr Leu Leu Lys Asn Phe Ala Val Glu Ile Cys Gln | |
| | 185 190 195 | |
| 30 | GCC GCG CAG ACC TGG ACG ATG GAA AAC TTC ATT GAC ACC GAG ATC CAG | 1097 |
| | Ala Ala Gln Thr Trp Thr Met Glu Asn Phe Ile Asp Thr Glu Ile Gln | |
| | 200 205 210 | |
| 35 | CGG ATC CGG ACC CTT GTG GGC CCC ACC GCG GAA GTC ATC GGT GCT GTG | 1145 |
| | Arg Ile Arg Thr Leu Val Gly Pro Thr Ala Glu Val Ile Gly Ala Val | |
| | 215 220 225 230 | |
| 40 | TCC GGC GGT GTC GAC TCG ACC GTC GCT GCG AAG CTG ATG ACC GAG GCC | 1193 |
| | Ser Gly Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Lys Leu Met Thr Glu Ala | |
| | 235 240 245 | |
| 45 | ATC GGC GAC CGG TTC CAC GCG ATC CTG GTC GAC AAC GGT GTT CTG CGC | 1241 |
| | Ile Gly Asp Arg Phe His Ala Ile Leu Val Asp Asn Gly Val Leu Arg | |
| | 250 255 260 | |
| 50 | CTC AAC GAA GCG GCC AAT GTG AAG AAA ATC CTC GGC GAG GGC TTG GGC | 1289 |
| | Leu Asn Glu Ala Ala Asn Val Lys Lys Ile Leu Gly Glu Gly Leu Gly | |
| | 265 270 275 | |
| 55 | ATC AAC TTG ACT GTT GTT GAC GCC TCC GAA GAG TTC TTG ACG AAG CTC | 1337 |
| | Ile Asn Leu Thr Val Val Asp Ala Ser Glu Glu Phe Leu Thr Lys Leu | |
| | 280 285 290 | |
| 60 | AAG GGC GTC ACG GAC CCT GAG AAG AAG AGA AAG ATC ATC GGT AAC ACC | 1385 |
| | Lys Gly Val Thr Asp Pro Glu Lys Lys Arg Lys Ile Ile Gly Asn Thr | |
| | 295 300 305 310 | |

| | | |
|----|---|------|
| | TTC ATT CAT GTT TTT GAG CGC GAG GCA GCC AGG ATC CAG CCT AAG AAC | 1433 |
| | Phe Ile His Val Phe Glu Arg Glu Ala Ala Arg Ile Gln Pro Lys Asn | |
| | 315 320 325 | |
| 5 | GGC GAG GAG ATT GAG TTC CTG TTG CAG GGT ACC CTA TAC CCT GAC GTT | 1481 |
| | Gly Glu Glu Ile Glu Phe Leu Leu Gln Gly Thr Leu Tyr Pro Asp Val | |
| | 330 335 340 | |
| 10 | ATC GAG TCC ATT TCC TTT AAG GGC CCA TCT CAG ACG ATC AAG ACC CAC | 1529 |
| | Ile Glu Ser Ile Ser Phe Lys Gly Pro Ser Gln Thr Ile Lys Thr His | |
| | 345 350 355 | |
| 15 | CAT AAC GTC GGT GGT CTT TTG GAC AAC ATG AAA CTG AAG CTC ATT GAG | 1577 |
| | His Asn Val Gly Gly Leu Leu Asp Asn Met Lys Leu Lys Leu Ile Glu | |
| | 360 365 370 | |
| 20 | CCT TTG CGC GAG CTT TTC AAG GAC GAG GTG AGA CAC CTG GGA GAA CTA | 1625 |
| | Pro Leu Arg Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val Arg His Leu Gly Glu Leu | |
| | 375 380 385 390 | |
| 25 | TTG GGG ATC TCC CAC GAG TTG GTC TGG AGA CAT CCG TTC CCA GGC CCA | 1673 |
| | Leu Gly Ile Ser His Glu Leu Val Trp Arg His Pro Phe Pro Gly Pro | |
| | 395 400 405 | |
| 30 | GGT ATC GCC ATC CGT GTG CTA GGC GAG GTC ACC AAG GAG CAG GTG GAG | 1721 |
| | Gly Ile Ala Ile Arg Val Leu Gly Glu Val Thr Lys Glu Gln Val Glu | |
| | 410 415 420 | |
| 35 | ATT GCC AGA AAG GCA GAC CAC ATC TAC ATC GAG GAG ATC AGG AAA GCA | 1769 |
| | Ile Ala Arg Lys Ala Asp His Ile Tyr Ile Glu Glu Ile Arg Lys Ala | |
| | 425 430 435 | |
| 40 | GGT CTA TAC AAC AAG ATT TCT CAA GCT TTT GCT TGC TTG CTG CCT GTT | 1817 |
| | Gly Leu Tyr Asn Lys Ile Ser Gln Ala Phe Ala Cys Leu Leu Pro Val | |
| | 440 445 450 | |
| 45 | AAG TCT GTG GGT GTC ATG GGT GAC CAG AGA ACC TAC GAC CAG GTC ATT | 1865 |
| | Lys Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gln Arg Thr Tyr Asp Gln Val Ile | |
| | 455 460 465 470 | |
| 50 | GCT CTA AGA GCA ATT GAG ACC ACG GAC TTC ATG ACT GCC GAC TGG TAT | 1913 |
| | Ala Leu Arg Ala Ile Glu Thr Thr Asp Phe Met Thr Ala Asp Trp Tyr | |
| | 475 480 485 | |
| 55 | CCA TTT GAG CAC GAA TTC TTG AAG CAT GTC GCA TCC CGT ATT GTT AAC | 1961 |
| | Pro Phe Glu His Glu Phe Leu Lys His Val Ala Ser Arg Ile Val Asn | |
| | 490 495 500 | |
| 60 | GAG GTT GAA GGT GTT GCC AGA GTC ACC TAC GAC ATA ACT TCT AAG CCT | 2009 |
| | Glu Val Glu Gly Val Ala Arg Val Thr Tyr Asp Ile Thr Ser Lys Pro | |
| | 505 510 515 | |

CCA GCT ACC GTT GAA TGG GAA TAATCACCT TGGGATCCGC TGA CTGGCTA 2060
 Pro Ala Thr Val Glu Trp Glu
 520 525

5 CTGTAATTCT ATGTAGTGGA TTAGTACGAT AAGTTACTTT TGTATGATAG ATGTAATCAC 2120
 ATCTGGCTAT TAAAATGACT CAGCCGAGGT AAATCTAACG TCCCTTCACA AGGGTGTTC 2180
 10 TGTGTGGACT TCCGCCTGAA TTTTATAGA TATATAGATA CTCTACTCAT GAACAACCTG 2240
 CAACCGAATA AGCATTAGTG CCAGGAGAAG AGAACCGTGG AAATGGGGCA AGTAGAAAAA 2300
 ATCATATTCC TTAAGAATAA GACAGTACCA GAGGACCATT ACGAGACGAT TTTTGAATCG 2360
 15 AATGGCTTCC AGACTCACTT TGTACCCATA ATAACCCATG AACACCTGCC AGATGAGGTT 2420
 CGCGGTGCGAC TATCCGACGC GAATTACATG AAAAGGTTGA ATTGTTTGGT GGTAACCTCT 2480
 CAGAGGACTG TGGAGTGTCT CTATGAGGAC GTTCTGCCCT CTCTCCAGC TGAAGCACGC 2540
 20 AAATCTCTTC TCAATACGCC AGTATTCGTG GTTGGGCGTG CCACTCAGGA ATTTATGGAG 2600
 AGATGCGGCT TTACGGACGT GAGAGGGGGA TCTGAGACTG GTAATGGCGT TTTGCTAGCG 2660
 GAGTTAATGT TAAATATGAT CCAGAAGGGC GATGGGG 2697

25 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 525 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

35 Met Ala Ala Val Glu Gln Val Ser Ser Val Phe Asp Thr Ile Leu Val
 1 5 10 15
 40 Leu Asp Phe Gly Ser Gln Tyr Ser His Leu Ile Thr Arg Arg Leu Arg
 20 25 30
 Glu Phe Asn Val Tyr Ala Glu Met Leu Pro Cys Thr Gln Lys Ile Ser
 35 40 45
 45 Glu Leu Gly Trp Lys Pro Lys Gly Val Ile Leu Ser Gly Gly Pro Tyr
 50 55 60
 Ser Val Tyr Ala Ala Asp Ala Pro His Val Asp Arg Ala Val Phe Glu
 65 70 75 80
 50 Leu Gly Val Pro Ile Leu Gly Ile Cys Tyr Gly Leu Gln Glu Leu Ala
 85 90 95

Trp Ile Ala Gly Ala Glu Val Gly Arg Gly Glu Lys Arg Glu Tyr Gly
 100 105 110
 5 Arg Ala Thr Leu His Val Glu Asp Ser Ala Cys Pro Leu Phe Asn Asn
 115 120 125
 Val Asp Ser Ser Thr Val Trp Met Ser His Gly Asp Lys Leu His Ala
 130 135 140
 10 Leu Pro Ala Asp Phe His Val Thr Ala Thr Thr Glu Asn Ser Pro Phe
 145 150 155 160
 Cys Gly Ile Ala His Asp Ser Lys Pro Ile Phe Gly Ile Gln Phe His
 165 170 175
 15 Pro Glu Val Thr His Ser Ser Gln Gly Lys Thr Leu Leu Lys Asn Phe
 180 185 190
 Ala Val Glu Ile Cys Gln Ala Ala Gln Thr Trp Thr Met Glu Asn Phe
 195 200 205
 20 Ile Asp Thr Glu Ile Gln Arg Ile Arg Thr Leu Val Gly Pro Thr Ala
 210 215 220
 25 Glu Val Ile Gly Ala Val Ser Gly Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala
 225 230 235 240
 Lys Leu Met Thr Glu Ala Ile Gly Asp Arg Phe His Ala Ile Leu Val
 245 250 255
 30 Asp Asn Gly Val Leu Arg Leu Asn Glu Ala Ala Asn Val Lys Lys Ile
 260 265 270
 Leu Gly Glu Gly Leu Gly Ile Asn Leu Thr Val Val Asp Ala Ser Glu
 275 280 285
 35 Glu Phe Leu Thr Lys Leu Lys Gly Val Thr Asp Pro Glu Lys Lys Arg
 290 295 300
 40 Lys Ile Ile Gly Asn Thr Phe Ile His Val Phe Glu Arg Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Arg Ile Gln Pro Lys Asn Gly Glu Glu Ile Glu Phe Leu Leu Gln Gly
 325 330 335
 45 Thr Leu Tyr Pro Asp Val Ile Glu Ser Ile Ser Phe Lys Gly Pro Ser
 340 345 350
 Gln Thr Ile Lys Thr His His Asn Val Gly Gly Leu Leu Asp Asn Met
 355 360 365
 50 Lys Leu Lys Leu Ile Glu Pro Leu Arg Glu Leu Phe Lys Asp Glu Val
 370 375 380

55

Arg His Leu Gly Glu Leu Leu Gly Ile Ser His Glu Leu Val Trp Arg
 385 390 395 400
 5 His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Ile Ala Ile Arg Val Leu Gly Glu Val
 405 410 415
 Thr Lys Glu Gln Val Glu Ile Ala Arg Lys Ala Asp His Ile Tyr Ile
 420 425 430
 10 Glu Glu Ile Arg Lys Ala Gly Leu Tyr Asn Lys Ile Ser Gln Ala Phe
 435 440 445
 Ala Cys Leu Leu Pro Val Lys Ser Val Gly Val Met Gly Asp Gln Arg
 450 455 460
 15 Thr Tyr Asp Gln Val Ile Ala Leu Arg Ala Ile Glu Thr Thr Asp Phe
 465 470 475 480
 Met Thr Ala Asp Trp Tyr Pro Phe Glu His Glu Phe Leu Lys His Val
 485 490 495
 20 Ala Ser Arg Ile Val Asn Glu Val Glu Gly Val Ala Arg Val Thr Tyr
 500 505 510
 25 Asp Ile Thr Ser Lys Pro Pro Ala Thr Val Glu Trp Glu
 515 520 525

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1634 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Doppel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
 (B) LAGE: 1..519

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 520..1482

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
 (B) LAGE: 1483..1634

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CCTCGAACAT CTATCTTCTG AGCTCGATAG TCTACGAAAT CGGCACACTA GCCTAATTGC 60
 CGAGATGAAG AGCTCCAGGG AACCGTTAAA GATCTGATGT TCCATCTTCA ATCAGGACAA 120
 5 ATGTTACGGG ATGTCCCTGA CGCCACAGAA GGTAGCCTGG TGGTCCAGAC AGAAAAAGAG 180
 CCTACACCAA AGAAGAAACA TAACAAGAAA AAGCCTCCGC ATCGTTTTGG TAAATCATAA 240
 TAGGCACGAT GCGCATATAC CCTGACCATC ATAGCGGTTC CCCCCGCTAA CTGCTCCGAG 300
 10 CGGGTAACCC CATGTCACAA AGTGACTCTG TCTCTTCGTG GTAGGTGATG TCAAATTTTC 360
 ACGACTTCCC ACCCCGATGA GCATCCGTAT TCCTTTTCAT CTAAATTCTA ATAGATGGCT 420
 15 TATGGATTCT TATTGGCGAC TTACAAGCCT ATGTAGTTGG CTTCCCTCAA GTGTTCGTAG 480
 TCTACCACCT CACACCCGGT CTAACAGCTT ACGAGAATA ATG GCT ACT AAT GCA 534
 Met Ala Thr Asn Ala
 1 5
 20 ATC AAG CTT CTT GCG CCA GAT ATC CAC AGG GGT CTG GCA GAG CTG GTC 582
 Ile Lys Leu Leu Ala Pro Asp Ile His Arg Gly Leu Ala Glu Leu Val
 10 15 20
 25 GCT AAA CGC CTA GGC TTA CGT CTG ACA GAC TGC AAG CTT AAG CGG GAT 630
 Ala Lys Arg Leu Gly Leu Arg Leu Thr Asp Cys Lys Leu Lys Arg Asp
 25 30 35
 30 TGT AAC GGG GAG GCG ACA TTT TCG ATC GGA GAA TCT GTT CGA GAC CAG 678
 Cys Asn Gly Glu Ala Thr Phe Ser Ile Gly Glu Ser Val Arg Asp Gln
 40 45 50
 GAT ATC TAC ATC ATC ACG CAG GTG GGG TCC GGG GAC GTG AAC GAC CGA 726
 Asp Ile Tyr Ile Ile Thr Gln Val Gly Ser Gly Asp Val Asn Asp Arg
 55 60 65
 35 GTG CTG GAG CTG CTC ATC ATG ATC AAC GCT AGC AAG ACG GCG TCT GCG 774
 Val Leu Glu Leu Leu Ile Met Ile Asn Ala Ser Lys Thr Ala Ser Ala
 70 75 80 85
 40 CGG CGA ATT ACG GCT GTG ATT CCA AAC TTC CCA TAC GCG CGG CAG GAC 822
 Arg Arg Ile Thr Ala Val Ile Pro Asn Phe Pro Tyr Ala Arg Gln Asp
 90 95 100
 45 CGG AAG GAT AAG TCA CGG GCG CCA ATT ACC GCG AAG CTC ATG GCG GAC 870
 Arg Lys Asp Lys Ser Arg Ala Pro Ile Thr Ala Lys Leu Met Ala Asp
 105 110 115
 50 ATG CTG ACT ACC GCG GGC TGC GAT CAT GTC ATC ACC ATG GAC TTA CAC 918
 Met Leu Thr Thr Ala Gly Cys Asp His Val Ile Thr Met Asp Leu His
 120 125 130

55

GCT TCG CAA ATC CAG GGC TTC TTT GAT GTA CCA GTT GAC AAC CTT TAC 966
 Ala Ser Gln Ile Gln Gly Phe Phe Asp Val Pro Val Asp Asn Leu Tyr
 135 140 145

5 GCA GAG CCT AGC GTG GTG AAG TAT ATC AAG GAG CAT ATT CCC CAC GAC 1014
 Ala Glu Pro Ser Val Val Lys Tyr Ile Lys Glu His Ile Pro His Asp
 150 155 160 165

10 GAT GCC ATC ATC ATC TCG CCG GAT GCT GGT GGT GCC AAA CGT GCG TCG 1062
 Asp Ala Ile Ile Ile Ser Pro Asp Ala Gly Gly Ala Lys Arg Ala Ser
 170 175 180

15 CTT CTA TCA GAT CGC CTA AAC TTG AAC TTT GCG CTG ATT CAT AAG GAA 1110
 Leu Leu Ser Asp Arg Leu Asn Leu Asn Phe Ala Leu Ile His Lys Glu
 185 190 195

CGT GCA AAG GCA AAC GAA GTG TCC CGC ATG GTT CTG GTC GGC GAT GTT 1158
 Arg Ala Lys Ala Asn Glu Val Ser Arg Met Val Leu Val Gly Asp Val
 200 205 210

20 ACC GAT AAA GTC TGC ATT ATC GTT GAC GAT ATG GCG GAT ACT TGT GGT 1206
 Thr Asp Lys Val Cys Ile Ile Val Asp Asp Met Ala Asp Thr Cys Gly
 215 220 225

25 ACG CTG GCC AAG GCG GCA GAA GTG CTG CTA GAG CAC AAC GCG CGG TCT 1254
 Thr Leu Ala Lys Ala Ala Glu Val Leu Leu Glu His Asn Ala Arg Ser
 230 235 240 245

30 GTG ATA GCC ATT GTT ACC CAC GGT ATC CTT TCA GGA AAG GCC ATT GAG 1302
 Val Ile Ala Ile Val Thr His Gly Ile Leu Ser Gly Lys Ala Ile Glu
 250 255 260

AAC ATC AAC AAT TCG AAG CTT GAT AGG GTT GTG TGT ACC AAC ACC GTG 1350
 Asn Ile Asn Asn Ser Lys Leu Asp Arg Val Val Cys Thr Asn Thr Val
 265 270 275

35 CCA TTC GAG GAG AAG ATG AAG TTA TGC CCG AAG TTA GAT GTA ATT GAT 1398
 Pro Phe Glu Glu Lys Met Lys Leu Cys Pro Lys Leu Asp Val Ile Asp
 280 285 290

40 ATC TCG GCA GTT CTT GCG GAA TCC ATT CGC CGT CTA CAC AAT GGT GAA 1446
 Ile Ser Ala Val Leu Ala Glu Ser Ile Arg Arg Leu His Asn Gly Glu
 295 300 305

45 AGT ATC TCC TAC CTC TTT AAA AAC AAC CCA CTA TGATTTTGCT TCTCGATGCT 1499
 Ser Ile Ser Tyr Leu Phe Lys Asn Asn Pro Leu
 310 315 320

GGCTTCTTGA GGGCCAATTT TGCCGTAGAG GTAGTATCCC TTCTTTTAT ATTGACTATT 1559

50 TAACGAAGAC TATTTCTTCA TAAATGGACT TCGGCTTCAC TGTGAATCTC ACATGATATA 1619

GTTGTTTCAG AGACC 1634

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 320 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Met Ala Thr Asn Ala Ile Lys Leu Leu Ala Pro Asp Ile His Arg Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Glu Leu Val Ala Lys Arg Leu Gly Leu Arg Leu Thr Asp Cys
 20 25 30
 Lys Leu Lys Arg Asp Cys Asn Gly Glu Ala Thr Phe Ser Ile Gly Glu
 35 40 45
 Ser Val Arg Asp Gln Asp Ile Tyr Ile Ile Thr Gln Val Gly Ser Gly
 50 55 60
 Asp Val Asn Asp Arg Val Leu Glu Leu Leu Ile Met Ile Asn Ala Ser
 65 70 75 80
 Lys Thr Ala Ser Ala Arg Arg Ile Thr Ala Val Ile Pro Asn Phe Pro
 85 90 95
 Tyr Ala Arg Gln Asp Arg Lys Asp Lys Ser Arg Ala Pro Ile Thr Ala
 100 105 110
 Lys Leu Met Ala Asp Met Leu Thr Thr Ala Gly Cys Asp His Val Ile
 115 120 125
 Thr Met Asp Leu His Ala Ser Gln Ile Gln Gly Phe Phe Asp Val Pro
 130 135 140
 Val Asp Asn Leu Tyr Ala Glu Pro Ser Val Val Lys Tyr Ile Lys Glu
 145 150 155 160
 His Ile Pro His Asp Asp Ala Ile Ile Ile Ser Pro Asp Ala Gly Gly
 165 170 175
 Ala Lys Arg Ala Ser Leu Leu Ser Asp Arg Leu Asn Leu Asn Phe Ala
 180 185 190
 Leu Ile His Lys Glu Arg Ala Lys Ala Asn Glu Val Ser Arg Met Val
 195 200 205
 Leu Val Gly Asp Val Thr Asp Lys Val Cys Ile Ile Val Asp Asp Met
 210 215 220

Ala Asp Thr Cys Gly Thr Leu Ala Lys Ala Ala Glu Val Leu Leu Glu
 225 230 235 240
 5 His Asn Ala Arg Ser Val Ile Ala Ile Val Thr His Gly Ile Leu Ser
 245 250 255
 Gly Lys Ala Ile Glu Asn Ile Asn Asn Ser Lys Leu Asp Arg Val Val
 10 260 265 270
 Cys Thr Asn Thr Val Pro Phe Glu Glu Lys Met Lys Leu Cys Pro Lys
 275 280 285
 15 Leu Asp Val Ile Asp Ile Ser Ala Val Leu Ala Glu Ser Ile Arg Arg
 290 295 300
 Leu His Asn Gly Glu Ser Ile Ser Tyr Leu Phe Lys Asn Asn Pro Leu
 20 305 310 315 320

Patentansprüche

1. Protein mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO:2 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 15% der Aminosäuren erhältlichen Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer Phosphoribosylpyrophosphat-Synthetase.
2. Protein nach Anspruch 1, das keine feed-back Hemmung durch Folgeprodukte von Stoffwechselwegen, die von Produkten des Enzyms ausgehen, mehr aufweist.
3. Protein nach Anspruch 1, das nicht mehr durch Zwischenprodukte der Purinbiosynthese, insbesondere durch Purinbasen, Purinnukleoside, Purinnukleotid-5'-Monophosphate oder Purinnukleotid-5'-Diphosphate oder Purinnukleotid-5'-Triphosphate gehemmt werden.
4. Protein nach Anspruch 1, bei dem eine oder mehrere der folgenden Aminosäureaustausche vorliegen: Lysin an Position 7 ausgetauscht gegen Valin, Aspartat an Position 52 ausgetauscht gegen Histidin, Leucin an Position 133 ausgetauscht gegen Isoleucin, Aspartat an Position 186 ausgetauscht gegen Histidin, Alanin an Position 193 ausgetauscht gegen Valin oder Histidin an Position 196 ausgetauscht gegen Glutamin.
5. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein gemäß Anspruch 1.
6. Protein mit der in SEQ ID NO: 13 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO: 13 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 10% der Aminosäuren erhältlichen Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer Phosphoribosylpyrophosphat-Synthetase.
7. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein gemäß Anspruch 6.
8. Protein mit der in SEQ ID NO:5 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO:5 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 10% der Aminosäuren erhältlichen Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase.
9. Protein nach Anspruch 8, das keine feed-back Hemmung durch Folgeprodukte von Stoffwechselwegen, die von Produkten des Enzyms ausgehen, mehr aufweist.

10. Protein nach Anspruch 8, das nicht mehr durch Zwischenprodukte der Purinbiosynthese, insbesondere durch Purinbasen, Purinnukleoside, Purinnukleotid-5'-Monophosphate oder Purinnukleotid-5'-Diphosphate oder Purinnukleotid-5'-Triphosphate gehemmt werden.
- 5 11. Protein nach Anspruch 8, bei dem eine oder mehrere der folgenden Aminosäureaustausche vorliegen: Aspartat an Position 310 ausgetauscht gegen Valin, Lysin an Position 333 ausgetauscht gegen Alanin oder Alanin an Position 417 ausgetauscht gegen Tryptophan.
12. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein gemäß Anspruch 8.
- 10 13. Protein mit der in SEQ ID NO:8 und 9 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO:8 und 9 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 20% der Aminosäuren erhältlichen Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer IMP-Dehydrogenase.
- 15 14. Protein nach Anspruch 13, das keine feed-back Hemmung durch Folgeprodukte von Stoffwechselwegen, die von Produkten des Enzyms ausgehen, mehr aufweist.
15. Protein nach Anspruch 13, das nicht mehr durch Zwischenprodukte der Purinbiosynthese, insbesondere durch Purinbasen, Purinnukleoside, Purinnukleotid-5'-Monophosphate oder Purinnukleotid-5'-Diphosphate oder Purinnukleotid-5'-Triphosphate gehemmt werden.
- 20 16. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein gemäß Anspruch 13.
17. Protein mit der in SEQ ID NO:11 dargestellten Polypeptidsequenz oder einer aus SEQ ID NO:11 durch Substitution, Insertion oder Deletion von bis zu 10% der Aminosäuren erhältlichen Polypeptidsequenz und der enzymatischen Aktivität einer GMP-Synthetase.
- 25 18. Protein nach Anspruch 17, das keine feed-back Hemmung durch Folgeprodukte von Stoffwechselwegen, die von Produkten der Enzyme ausgehen, mehr aufweist.
- 30 19. Protein nach Anspruch 17, das nicht mehr durch Zwischenprodukte der Purinbiosynthese, insbesondere durch Purinbasen, Purinnukleoside, Purinnukleotid-5'-Monophosphate oder Purinnukleotid-5'-Diphosphate oder Purinnukleotid-5'-Triphosphate gehemmt werden.
- 35 20. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein gemäß Anspruch 17.
21. Verwendung einer oder mehrerer der Nukleinsäuresequenzen nach den oben genannten Ansprüchen zur gentechnischen Konstruktion von Mikroorganismen, die zur Herstellung von Riboflavin in der Lage sind.
- 40 22. Verfahren zur Herstellung von Riboflavin durch Kultivierung von Mikroorganismen, die in mindestens einem Gen der Purinbiosynthese genetisch verändert worden sind.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium der Gattung Bacillus oder Corynebakterium handelt.
- 45 24. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um einen eukaryontischen Mikroorganismus handelt.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um *Ashbya gossypii* handelt.
- 50 26. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um eine Hefe handelt.
- 55 27. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um eine Hefe der Gattung Candida, Saccharomyces oder Pichia handelt.
28. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung in mindestens einer zusätzlichen

Kopie von mindestens einer der Nukleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 5, 12, 16, 20 besteht.

29. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß durch die genetische Veränderung ein Gen codierend für ein Protein gemäß Anspruch 1, 6, 13, 17 erzeugt wird.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Abb. 1

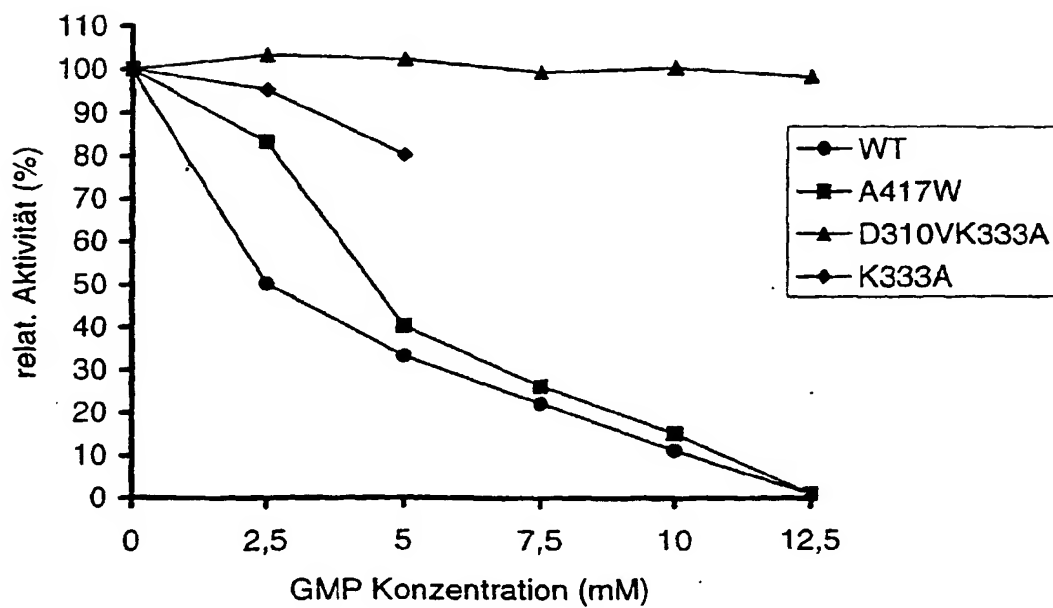
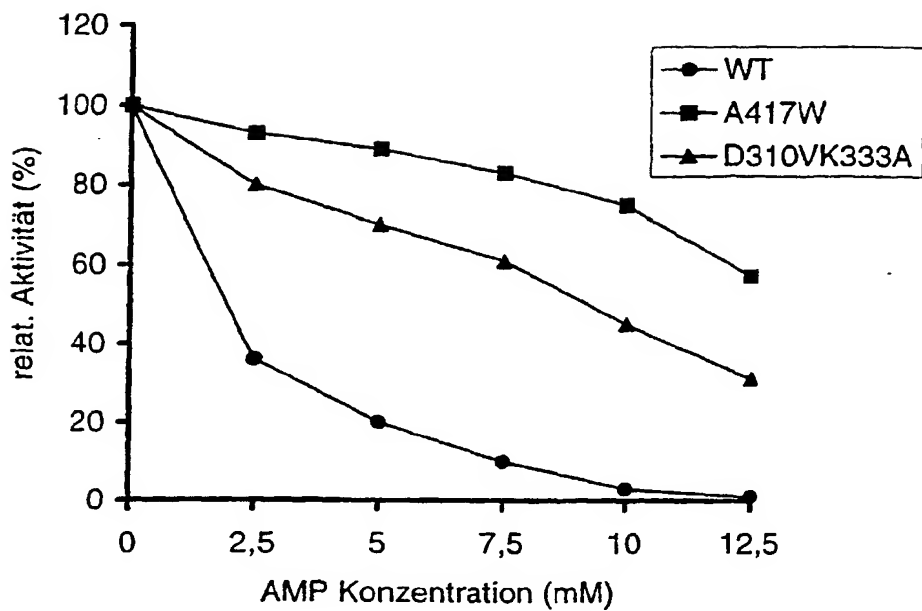
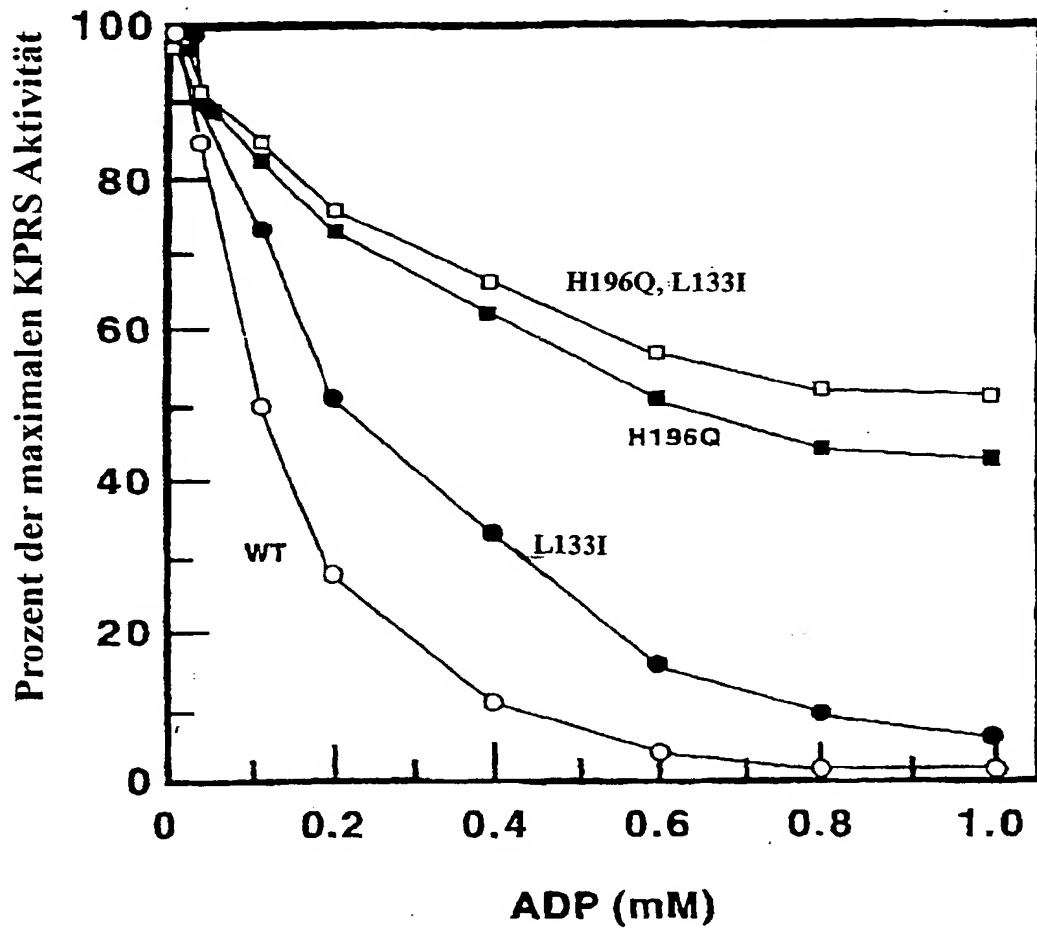


Abb. 2



Hemmung der Wildtyp und mutagenisierten KPRS durch ADP



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Publication number:

0 405 370 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: 90111916.4

(22) Date of filing: 22.06.90

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/52, C12P 25/00,**
C12N 1/20, //(C12N1/20,
C12R1:125,1:19)

(30) Priority: 22.06.89 US 370378

(43) Date of publication of application:
02.01.91 Bulletin 91/01

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL

(71) Applicant: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Postfach 3255
CH-4002 Basel(CH)

(72) Inventor: Perkins, John B.
66 Hopkins Street
Reading, Massachusetts 01867(US)
Inventor: Pero, Janice G.
20 Solomon Pierce Road
Lexington, Massachusetts 02173(US)
Inventor: Sloma, Alan
20 James Street
Watertown, Massachusetts 02172(US)

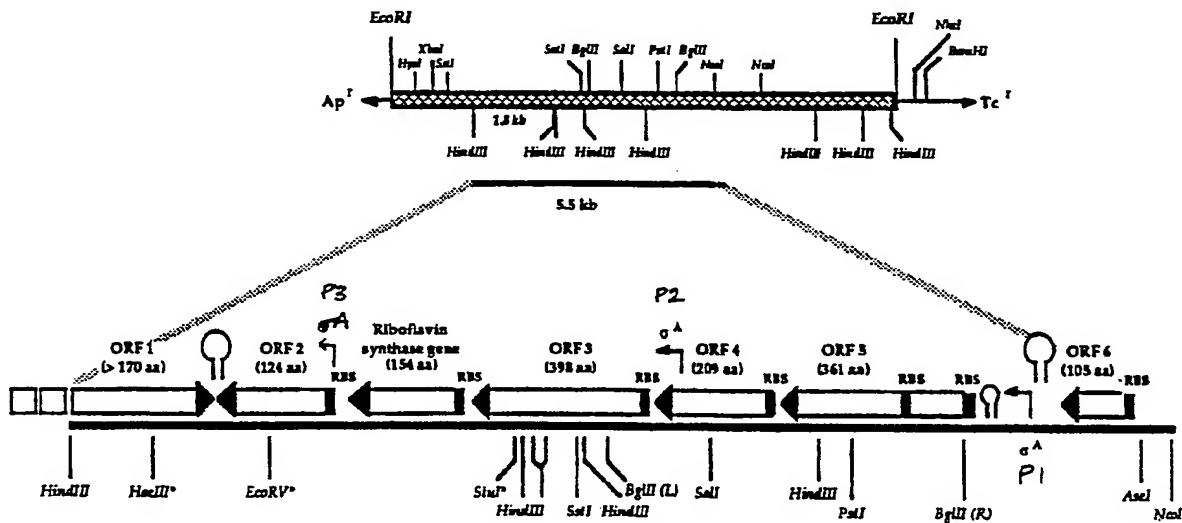
(74) Representative: Lederer, Franz, Dr. et al
Lederer, Keller & Riederer, Patentanwälte,
Lucile-Grahn-Strasse 22 22
D-8000 München 80(DE)

(54) **Riboflavinoverproducing strains of bacteria.**

(57) The present invention is directed to bacteria that overproduce riboflavin. The invention concerns the nucleotide sequence of the rib operon and its open reading frames, and recombinant bacteria that contain the rib operon. Specifically, the invention relates to bacteria that have been mutated so that their production of riboflavin and/or purines is deregulated, and which have copies of the rib operon inserted and amplified in their chromosomal DNA. In a specific embodiment, the rib operon itself can be deregulated by replacing its control regions with sequences that allow constitutive or unregulated expression. The bacteria, operons and sequences of this invention are used to overproduce relatively large amounts of riboflavin by fermentation.

EP 0 405 370 A1

FIGURE 4.



RIBOFLAVINOVERPRODUCING STRAINS OF BACTERIA

Riboflavin (vitamin B₂) is synthesized by all plants and many microorganisms but is not produced by higher animals. Because it is a precursor to coenzymes such as flavin adenine dinucleotide and flavin mononucleotide, that are required in the enzymatic oxidation of carbohydrates, riboflavin is essential to basic metabolism. In higher animals, insufficient riboflavin can cause loss of hair, inflammation of the skin, vision deterioration, and growth failure.

Riboflavin can be commercially produced either by a complete chemical synthesis, starting with ribose, or by fermentation with the fungi *Eremothecium ashbyii* or *Ashbya gossypii* (The Merck Index, Windholz et al., eds., Merck & Co., p. 1183, 1983). Mutants of *Bacillus subtilis*, selected by exposure to the purine analogs azaguanine and azaxanthine, have been reported to produce riboflavin in recoverable amounts (U.S. Patent No. 3,900,368, Enei et al., 1975). In general, exposure to purine or riboflavin analogs selects for deregulated mutants that exhibit increased riboflavin biosynthesis, because the mutations allow the microorganism to "compete out" the analog by increased production (Matsui et al., Agric. Biol. Chem. 46:2003, 1982). A purine-requiring mutant of *Saccharomyces cerevisiae* that produces riboflavin has also been reported (U.S. Patent No. 4,794,081, Kawai et al., 1988). Rabinovich et al. (Genetika 14 :1696 (1978)) report that the riboflavin operon (rib operon) of *B. subtilis* is contained within a 7 megadalton (Md) EcoRI fragment (later referred to as a 6.3 Md fragment in Chikindas et al., Mol. Genet. Mik. Virusol. no. 2:20 (1987)). It is reported that amplification of the rib operon may have been achieved in *E. coli* by cloning the operon into a plasmid that conferred resistance to ampicillin and exposing bacteria containing that plasmid to increasing amounts of the antibiotic. The only evidence for rib amplification is a coincident increase in the presence of a green-fluorescing substance in the medium; the authors present a number of alternative possibilities besides an actual amplification of the operon to explain the phenomenon observed.

French Patent Application No. 2,546,907, by Stepanov et al. (published December 7, 1984), discloses a method for producing riboflavin that utilizes a mutant strain of *B. subtilis* which has been exposed to azaguanine and roseoflavin and that is transformed with a plasmid containing a copy of the rib operon.

Morozov et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. no. 7:42 (1984)) describe the mapping of the *B. subtilis* rib operon by assaying the ability of cloned *B. subtilis* rib fragments to complement *E. coli* riboflavin auxotrophs or to marker-rescue *B. subtilis* riboflavin auxotrophs. Based on the known functions of the *E. coli* rib genes, the following model was proposed for the *B. subtilis* operon: ribG (encoding a deaminase) - ribO (the control element) - ribB (a synthetase) - ribF - ribA (a GTP-cyclohydrolase) - ribT/D (a reductase and an isomerase, respectively) - ribH (a synthetase).

Morozov et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. no. 11:11 (1984)) describe the use of plasmids containing the *B. subtilis* rib operon with either wild-type (ribO⁺) or constitutive (ribO 335) operator regions to assay their ability to complement *B. subtilis* riboflavin auxotrophs. From the results, a revised model of the rib operon was proposed, with ribO now located upstream of all of the structural genes, including ribG, and with the existence of an additional operator hypothesized, possibly located just upstream of ribA.

Morozov et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. no. 12:14 (1985)) report that the *B. subtilis* rib operon contains a total of three different promoters (in addition to a fourth "promoter" that is only active in *E. coli*). The primary promoter of the operon was reported to be located within the ribO region, with the two secondary promoters reported between the ribB and ribF genes and within the region of the ribTD and ribH genes, respectively.

Chikindas et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. no. 2:20 (1987)) propose a restriction enzyme map for a 6.3 Md DNA fragment that contains the rib operon of *B. subtilis*. Sites are indicated for the enzymes EcoRI, PstI, Sall, EcoRV, PvuII and HindIII.

Chikindas et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. no. 4:22 (1987)) report that all of the structural genes of the *B. subtilis* rib operon are located on a 2.8 Md BglII-HindIII fragment and that the BglII site is located between the primary promoter of the operon and the ribosomal-binding site of its first structural gene. As described infra, Applicants show that this BglII site is actually located within the most-5' open reading frame of the rib operon, so that the 2.8 Md fragment described does not contain all of the rib structural genes. Thus, in contrast to the report of Chikindas et al., the 1.3 Md BglII fragment does not contain the ribosomal-binding site of the first structural gene; insertions at this site lead to a riboflavin-negative phenotype. Consequently, any attempt to use this BglII site to engineer the rib operon in order to increase expression, for example by replacing the 5' regulatory region with a stronger promoter, would actually destroy the integrity of the first structural gene and thus the operon as well.

Chikindas et al. (Dokl. Akad. Nauk. 5 SSSR 298 :997 (1988)) disclose another model of the *B. subtilis* rib operon, containing the primary promoter, p₁, and two minor promoters, p₂ and p₃: ribO(p₁)-ribG-ribB-p₂-

ribF-ribA-ribT-ribD-p₃-ribH As before, it is incorrectly reported that the 1.3 Md BglII fragment contains the entire first structural gene of the operon and that this proximal BglII site maps within the primary regulatory region.

The present invention is directed to bacteria that overproduce riboflavin. The invention relates to the nucleotide sequence of the rib operon and its open reading frames, and recombinant bacteria that contain the rib operon. Specifically, the invention is directed to bacteria that have been mutated so that their production of riboflavin and/or purines is deregulated, and to bacteria which have copies of the rib operon inserted and amplified within their chromosomal DNA. In one embodiment, the rib operon itself can be deregulated by replacing its control regions with sequences that allow constitutive or unregulated expression. The bacteria, operons and sequences of this invention can be used to produce large amounts of riboflavin by fermentation.

The present invention is illustrated by way of specific examples detailed below, for example, a mutant of *B. subtilis* 1A382, RB50::[pRF8]₆₀(Ade⁺), is produced that is deregulated for riboflavin and purine production and has the rib operon amplified within its chromosome. This mutant is able to produce greater than 5 g/l of riboflavin after 48 hours of fermentation in a 14-liter vessel. Other bacteria are described in which riboflavin production is increased to over 10 g/l under similar conditions.

This invention generally features the production of large quantities (over 10 g/l) of riboflavin by construction of various bacterial strains and growth of those bacterial strains within a medium and under conditions suitable for production of the riboflavin. In a first aspect, the invention features a recombinant bacterium which includes at least one copy of an exogenously introduced nucleic acid within its chromosome. This nucleic acid encodes one or more riboflavin biosynthetic proteins, is heritable, and capable of expression by the bacterium such that riboflavin biosynthesis by the bacterium is increased relative to a bacterium lacking such a sequence.

By "recombinant bacterium" is meant a bacterium which contains one or more nucleic acid sequences, from the same or another organism, at a site at which those sequences do not naturally occur, and/or in a copy number in which they do not naturally occur. Thus, the term includes those bacteria in which two copies of a nucleic acid sequence, e.g., a gene or an operon, are provided at a site which normally includes only one copy of the sequence. It also includes bacteria in which one or more copies of a nucleic acid sequence are introduced at a site which does not normally include that sequence. Such recombinant bacteria are constructed by standard recombinant DNA technology.

By "exogenously introduced" is meant that the nucleic acid is introduced into the chromosome from a source outside of that chromosome by any standard technique, including recombinant DNA technology, transformation, and transfection. It also includes the progeny of such bacteria, for example, those bacteria produced by cellular division of an originally constructed, transformed, or transfected bacterium.

By "riboflavin biosynthetic proteins" is meant to include those peptides, polypeptides or proteins which are directly involved in the synthesis of riboflavin from guanosine triphosphate. These proteins may be identical to those which naturally occur within a bacterium and are involved in the synthesis of riboflavin within that bacterium. Alternatively, they may be modifications of such proteins, for example, they may contain modifications which do not significantly affect the biological activity of the protein. For example, the natural protein may be modified by introducing or substituting one or more amino acids, preferably by conservative amino acid substitution, or by removing nonessential regions of the protein. Such modifications are readily performed by standard techniques.

In some embodiments, the bacterium contains two or more copies of the nucleic acid sequence; and the nucleic acid encoding one or more of the riboflavin biosynthetic proteins is present at at least two sites within the chromosome of the bacterium.

By "site" is meant a distinct chromosomal location relative to a wild-type bacterium at which the nucleic acid encoding the biosynthetic proteins is located. For example, such nucleic acid may be located at the naturally occurring site for genes encoding such proteins (i.e., at a rib locus), or it may be located at a site distant from this location. Preferably such distant sites are chosen from regions of chromosomal nucleic acid which are not essential to the recombinant bacterium, such as regions which encode proteins which are not essential to production of riboflavin. Examples of such regions include those which encode certain extracellular enzymes such as proteases. Insertion at such sites does not interfere with a desirable quality or trait. Any site is suitable as long as the functioning of the bacterium, with regard to riboflavin production, is not substantially affected.

In other embodiments, the nucleic acid is present in a plurality of copies at one or more of the sites; and the nucleic acid is present at at least three sites within the chromosome. By introducing the nucleic acid at different sites, the total number of copies of the nucleic acid within the chromosome can be increased. Increasing the copy number, increases the amount of riboflavin production.

Generally the riboflavin biosynthetic proteins are encoded by one or more rib genes (e.g., an inactivation of which creates a riboflavin auxotroph), preferably at least five distinct rib genes identifiable from the nucleotide sequence provided in Fig. 3. Preferably, at least five copies of such genes are provided. By "rib genes" is meant those genes or portions of genes which encode proteins which occur naturally within an organism, or perform a similar function to such proteins, which are involved in the biosynthetic conversion of guanosine triphosphate to riboflavin within a bacterium.

In a related aspect, the invention features a recombinant bacterium which includes nucleic acid encoding one or more riboflavin biosynthetic proteins, e.g., the gene products identified as ORF1 and ORF6 in Fig. 4, the expression of at least one of which is controlled by a transcription element not naturally associated with the nucleic acid. Alternatively, the recombinant bacterium includes one or more rib genes or transcription units the expression of which is controlled by a transcription element not naturally associated with that rib gene.

By "transcription element" is meant to include any nucleic acid which effects (i.e., turns on) the transcription of nucleic acid downstream from that transcription element. Examples of such elements include promoters and operators. Such transcription elements are not naturally associated with the nucleic acid, for example, they may be heterologous transcription elements. That is, they may be isolated from other species or genera of bacteria or other organisms. Alternatively, the transcription element may be one naturally present in the bacterium but not normally associated with a rib gene to which it is now transcriptionally linked. Such elements do not include those which are naturally associated with a rib gene.

In other embodiments, the recombinant bacterium includes at least three (or at least five) rib genes and the expression of all three rib genes is controlled by a transcription element not naturally associated with those rib genes; at least two transcription elements are provided; the rib genes are provided within the chromosome of the recombinant bacterium; the recombinant bacterium is deregulated for riboflavin gene expression; and the transcription element is a promoter. For example, the promoter is a constitutive, growth-regulated, or inducible promoter, such as one associated with the SPO1 phage, and/or veg, amy, and sacQ-sensitive promoters, e.g., apr.

By "deregulated" is meant that the level of riboflavin production is greater than that observed in a bacterium with natural riboflavin regulatory systems (i.e., a wild type bacterium). Examples of such deregulated bacteria include those which are resistant to various purine analogs or antagonists whereby such analogs or antagonists can e.g. be selected from the group consisting of 8-azaguanine, psicofuranine, decoyinine, 8-azaxanthine, sulfaguanine, 6-thioguanine, and methionine sulfoxide, and/or riboflavin analogs e.g. roseoflavin. Preferred deregulated bacteria are resistant to at least one of the following purine analogs or antagonists 8-azaguanine or decoyinine and roseoflavin.

In other specific embodiments, at least one of the rib genes includes a ribosome binding site not naturally associated with the rib gene; the rib genes are present at two sites within the chromosome; and the rib genes are present in a plurality of copies within the chromosome. In more preferred embodiments, the rib genes are Bacillus rib genes, for example ORF3 and ORF4 shown in Fig. 4, and the transcription element is located in a region 5'-upstream of ORF3 or ORF5; and the rib genes are chosen from a β -riboflavin synthase-encoding gene, ORF2, ORF3, ORF4, and ORF5; and the bacterium belongs to a species of Escherichia, e.g., E. coli, Bacillus, e.g., B. subtilis, Klebsiella, or Corynebacterium.

In another related aspect, the invention features nucleic acid, which includes five or more rib genes, the expression of which is controlled by a transcription element not naturally associated with that rib gene.

In a further aspect, the invention relates to a vector comprising first a nucleic acid sequence of bacterial especially Bacillus whereby B. subtilis is preferred or E. coli or yeast origin coding for one or more, whereby at least five is preferred, riboflavin biosynthetic proteins and second one or more whereby one or two is preferred transcription elements not naturally associated with this nucleic acid sequence. Such vectors are preferred whereby the transcription elements are as already specified above. Further preferred are vectors as specified in the Examples e.g. pRF50, pRF69 pRF70, pRF71, pRF78, pRF81 and/or pRF89.

Another aspect of the invention relates to a recombinant bacterium comprising a bacterium which has been transformed by a vector as specified above whereby at least one copy, preferably a plurality of copies of said nucleic acid sequence including said transcription elements has been introduced at one or more sites with in its chromosome and said nucleic acid sequence including said transcription elements is heritable and capable of expression by the bacterium, such that riboflavin biosynthesis by the bacterium is increased relative to a bacterium lacking such nucleic acid sequence including said transcription elements. Introduction at one or two such sites is preferred. Furthermore recombinant bacteria are preferred whereby the bacterium which is transformed is already deregulated for riboflavin gene expression. Of such deregulated bacteria E. coli or Bacillus especially B. subtilis strains are preferred whereby B. subtilis strains RB50 and RB58 are especially preferred.

The invention relates also to a process for the preparation of a recombinant bacterium whereby a bacterium especially as already specified above is transformed by a vector comprising a nucleic acid sequence of bacterial or yeast origin coding for one or more riboflavin biosynthetic proteins or a vector as already specified above whereby at least one copy, preferably a plurality of copies of said nucleic acid sequence optionally including said transcription elements is introduced at one or more, preferably one or two sites within its chromosome and said nucleic acid sequence optionally including said transcription elements is heritable and capable of expression by the bacterium, such that riboflavin biosynthesis by the bacterium is increased relative to a bacterium lacking such nucleic acid sequence optionally including said transcription elements.

The invention relates also to bacteria as specified herein wherein one or more transcription elements naturally associated with the rib biosynthetic genes in the chromosome of such bacteria have been replaced by transcription elements as specified. Such replacements can be made on the basis of the description of the present invention and by methods known in the art.

In another aspect, the invention features a method or process for production of riboflavin. The method includes growing cells especially recombinant bacteria as specifically mentioned herein under suitable growth conditions. Such suitable growth conditions are characterized by limiting the availability of a component of the growth medium and/or feed medium in such a way that aerobic conditions for the growth of said recombinant bacterium are maintained. Such conditions can be also characterized e.g. by maintaining a level of dissolved oxygen at a concentration between about 5% to 30%. The man skilled in the art is familiar with the fact that such levels of dissolved oxygen can vary dependent on the specific technical equipment used for growing said recombinant bacteria and for measuring said dissolved oxygen concentration. Under anaerobic conditions the synthesis of riboflavin is reduced. In some embodiments, the limiting component is chosen from a carbon source, nitrogen source, or a component required by the cells (e.g., in the feed medium). For example, if the cells are auxotrophic, for example, for methionine, a limiting level of methionine may be provided in the growth medium. In another example, such component could be glucose or a carbonic acid, e.g. a citric acid cycle acid, such as citric acid or succinic acid, or an amino acid.

In a related aspect, the invention features another method for increasing production of riboflavin by a bacterium. In this method, the strain of bacterium used is deregulated for riboflavin production. More than one copy of a nucleic sequence encoding one or more riboflavin biosynthetic proteins is introduced into the chromosomal DNA of this bacterium. Preferably the bacterium used in this method is selected from one of those described above. The invention relates also to a method for the production of riboflavin by growing a recombinant bacterium obtained by a process as specified above under conditions as also specified above.

In other aspects of the invention, purified nucleic acid and the recombinant polypeptide product of such nucleic acid is provided. Generally, the purified nucleic acid consists essentially of all or a portion of the rib operon, for example, the specific open reading frames shown in Fig. 3. Such purified nucleic acid may be provided within a vector such as a plasmid, phage, or cosmid, or may be integrated within the chromosome of a bacterium. This nucleic acid is separated from nucleic acid with which it is naturally linked. For example, 6.5 kb of the nucleic acid encoding the whole rib operon may be inserted within a *Bacillus subtilis* chromosome at a site distant from that site in which the 6.5 kb DNA is normally present. By recombinant polypeptide is meant biologically active protein free of extraneous polypeptide (i.e., not fused to a heterologous polypeptide) having an enzymatic activity equivalent to such a naturally produced polypeptide.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following description of the preferred embodiments thereof, and from the claims.

The drawings will first briefly be described:

Figure 1. The riboflavin biosynthetic pathway, modified from Keller et al., *Biochem.* 27 :1117 (1988). The corresponding intermediates shown are those produced by *E. coli* (which are presumably the same as those produced by *B. subtilis*): structure 1, guanosine triphosphate (GTP); structure 2, 2,5-diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinone-5'-phosphate; structure 3, 5-amino-6-(ribosylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione-5'-phosphate; structure 4, 5-amino-6-(ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione-5'-phosphate; structure 5, 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine; structure 6, riboflavin. The biosynthetic enzymes indicated are those encoded by *B. subtilis* (GTP cyclohydrolase, α and β subunits of riboflavin synthase) or those proposed to be encoded by *B. subtilis* (a rib-specific deaminase, and a rib-specific reductase).

Figure 2. Schematic representation of purine biosynthesis. The purine biosynthetic pathway, including the portion responsible for riboflavin biosynthesis, is depicted. The individual enzymes of the pathway are identified by their gene symbols (*E. coli* nomenclature). Abbreviations are as follows: PRPP, phosphoribosylpyrophosphate; GAR, glycylamide ribonucleotide; pur, GAR formyltransferase; PRA, phosphoribosylamine; purA, adenylosuccinate synthetase; purB, adenylosuccinate synthetase; FGAR,

formylglycinamide ribonucleotide; SAICAR, aminoimidazolesuccinocarboxamide ribonucleotide; purC, SAICAR synthetase; FGAM, formylglycinamidine ribonucleotide; purD, GAR synthetase; AIR, aminoimidazole ribonucleotide; purE, AIR carboxylase; CAIR, carboxyaminoimidazole ribonucleotide; purF, PRPP amidotransferase; AICAR, aminoimidazolecarboxamide ribonucleotide; purH, AICAR formyltransferase; purJ, inosine monophosphate (IMP) cyclohydrolase; FAICAR, formamidoimidazolecarboxamide ribonucleotide; purL, FGAR amidotransferase; guaA, guanosine monophosphate (GMP) synthetase; purM, AIR synthetase; guaB, IMP dehydrogenase.

Figure 3. The complete nucleotide and deduced amino acid sequences of the *B. subtilis* rib operon. The nucleotide sequence was determined by dideoxy sequencing of M13 clones. The deduced amino acid sequence is indicated by the one letter code (Lehninger, Biochemistry, 2d Ed., Worth Publishers, Inc., New York, p. 72).

Figure 4. A schematic representation of the rib gene cluster. The top diagram is the restriction endonuclease map of the cloned 10 kb EcoRI DNA fragment in plasmid pRF2, containing the *B. subtilis* rib operon. Homology to the 54-mer probe specific for the riboflavin synthase gene is depicted by the solid bar. The hatched box depicts Rib⁺ cloned DNA, while the thin black line represents pBR322 DNA. The bottom diagram is based on the complete nucleotide sequence of the 6.0 kb fragment to which the rib operon was localized. Open reading frames are depicted by open boxes, with arrows indicating the direction of transcription, and closed boxes indicating the putative ribosome binding sites. Probable σ^A promoter regions are shown. Tentatively identified rho-independent transcription termination sites are indicated by a "hairpin" symbol. Not all restriction sites are indicated.

Figure 5. Strain lineage of RB50. The lineage of the riboflavin overproducing strain of *B. subtilis*, RB50, is depicted. The various parent strains were exposed to riboflavin and purine analogs to select appropriate mutations.

Figure 6. Origins of rib⁺s recombinant plasmids. A schematic diagram of the production of the rib operon-containing recombinant plasmids pRF1, pRF2, pRF3, pRF6 and pRF7 is presented. A library of size-selected, 9-11 kb fragments of *B. subtilis* DNA was used to produce a gene library in *E. coli* plasmid vectors. Clones were selected by hybridization to the 54-mer probe specific for the β subunit of the riboflavin synthase gene.

Figure 7. The strain lineage of *B. subtilis* RB53::[pRFB]₉₀. Plasmid pRFB was integrated into the chromosome of the intermediate strain RB52 and amplified; the resulting strain was exposed to the purine analog azaguanine.

Figure 8. Identification of regions essential for riboflavin biosynthesis using insertions and deletions. A diagram is presented of the 10 kb cloned EcoRI DNA fragment with the regions essential for riboflavin biosynthesis indicated. Insertions and deletions at the indicated restriction sites enabled the localization of the rib operon. Not all restriction sites are indicated.

Figure 9. Hairpin-loop structures of the possible rho-independent transcription termination sites. Their locations in the nucleotide sequence of Figure 3 are shown below each structure. Also presented are their free energies of formation, determined according to Tinoco et al. (Nature (London) New Biology 246:40 (1973)).

Figure 10. Structure of various plasmid derivatives used in S-30 in vitro coupled transcriptiontranslation reactions. A schematic diagram is shown of the rib operon regions contained in the plasmid derivatives used in the S-30 reactions, as well as the open reading frames predicted to be expressed.

Figure 11. Comparison of riboflavin production curves. Riboflavin production curves for various fermentation protocols are shown. Open squares: RBF-14 using RB50::[pRF8]₆₀ (Ade⁻). Closed squares: RBF-22 using RB50::[pRF8]₆₀ (Ade⁻). Open circles: RBF-23 using RB50::[pRF8]₆₀ (Ade⁻). Closed circles: RBF-29 using RB50::[pRF8]₆₀ (Ade⁺).

Figure 12. Construction of pRF40.

Figure 13. Construction of pRF50.

Figures 14, 15, and 16. Structure of various vectors.

Figure 17. 55-mer used in plasmid construction.

Figure 18. Various oligonucleotides used in vector construction.

In the practice of the present invention, host bacterial strains are derived that contain one or more mutations in genes of the riboflavin biosynthetic pathway or in the biosynthetic pathway of various purines, which mutations lead to riboflavin overproduction. In one embodiment, such mutations lead to riboflavin overproduction by deregulating steps in the riboflavin biosynthetic pathway. In another embodiment, the mutations increase riboflavin production by causing an inhibition in the use in an alternative metabolic pathway of a precursor for riboflavin biosynthesis.

In a specific embodiment, desired mutations in the genetic background of the host bacteria can be

induced by exposure to analogs of purine or riboflavin that compete with their authentic counterparts in the metabolic pathways of the host; bacteria that survive such exposure will have mutations that allow them to overproduce the authentic counterpart to the analog, thus "competing out" the purine or riboflavin analog that would otherwise be lethal. The biosynthesis of riboflavin in *B. subtilis* originates with guanosine triphosphate (Figure 1, structure 1). Guanosine triphosphate (GTP), via guanosine monophosphate (GMP), is a product of the purine biosynthetic pathway (Figure 2). In a preferred embodiment, to obtain a host strain that overproduces riboflavin, one can use classical genetics to both increase the amount of GTP that the cell produces and to deregulate the riboflavin pathway. Purine overproduction in *B. subtilis* can be achieved by obtaining mutants resistant to purine analogs or antagonists. Examples of some of the purine analogs that can be used include but are not limited to 8-azaguanine (Ishii and Shio, *Agric. Biol. Chem.* 36 :1511, 1972; Konishi and Shiro, *Agric. Biol. Chem.* 32 :396, 1968), psicofuranine and decoyinine (Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.* 43 :1739, 1979; Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.* 43 :393, 1979), 8-azaxanthine, sulfaguanine, 6-thioguanine (Debabov, V.G. in *The Molecular Biology of the Bacilli* vol. 1 *Bacillus subtilis*, D.A. Dubnau, ed. (Academic Press, New York), pp. 331-370, 1982) and others, and/or the antagonist methionine sulfoxide (Matsui et al., *App. Env. Microbiol.* 34 :337, 1977), and any combination thereof.

The riboflavin pathway can be deregulated by obtaining mutants resistant to a riboflavin analog. An example of a riboflavin analog that can be utilized is roseoflavin (Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.* 46 :2003, 1982).

In a specific embodiment of the present invention, bacteria that are mutationally resistant to the analogs azaguanine, decoyinine and roseoflavin, can be used. Specific mutants resistant to each of these compounds are described below. Bacteria with mutations rendering them resistant to other analogs can also be used. It is also deemed within the scope of the present invention to utilize bacteria with different mutations rendering resistance to these same analogs, or different combinations of these mutations, either in combination, with or without, various mutations to other analogs.

If exposure to the analog alone does not produce resistant mutants at a high enough frequency, various mutagens can be used to increase the frequency of mutation in general and thus increase the number of analog-resistant mutants. As one example, ethyl methyl sulfonate can be used, but other mutagens including but not limited to nitrosoguanidine or UV irradiation can also be used.

Suitable bacterial hosts include all *Bacilli* species (including in a preferred embodiment *B. subtilis*), *E. coli*, and many other gram-positive and gram-negative bacteria. Species which can recognize the promoter sequences of the cloned rib operon to be inserted within their genome are suitable for use. The plasmids described below can be used to introduce rib genes into other bacteria by standard procedure, e.g., transformation. Expression of the inserted rib genes can be determined by spectroscopy as described below, or by observation of the bacteria under UV light, as described below.

In addition to creating mutations by exposure to purine or riboflavin analogs, bacterial strains that already contain mutations that are known to affect their purine or riboflavin biosynthetic pathways can be utilized. For example, the present invention makes use of but is not limited to *B. subtilis* strain 1A382, which contains the mutation *pur-60*, making it auxotrophic for adenine. Because this mutation blocks the utilization of the riboflavin precursor inosine monophosphate (IMP) in a metabolic pathway other than riboflavin production, increased amounts of IMP are available for riboflavin biosynthesis, thus increasing riboflavin production. There are many other mutations which can be utilized to potentially increase riboflavin production, including but not limited to *guaC3*, *his⁻* and others that are included within the scope of the present invention. The *guaC3* mutation prevents the conversion of GMP back into IMP (see Figure 2), thus increasing the amount of riboflavin biosynthetic precursors available.

Suitable mutations affecting riboflavin overproduction can be mapped by various methods known in the art. In a specific embodiment, a mutation can be mapped by complementation of auxotrophic mutants.

The riboflavin biosynthetic genes from various bacteria can be cloned for use in the present invention. Yeast or bacterial cells from species including but not limited to the genus *Bacillus*, *E. coli* and many other gram-positive-and-gram-negative bacteria can potentially serve as the nucleic acid source for the molecular cloning of the rib operon. The DNA containing the rib operon may be obtained, by standard procedures known in the art, for example, from a DNA library prepared by cloning chromosomal DNA or fragments thereof, purified from the desired bacterial cell, into a suitable vector for propagation of the gene. (See, for example, Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1982, *DNA Cloning: A Practical Approach*, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K., Vol. I, II).

In the molecular cloning of the gene from chromosomal DNA, fragments are generated, some of which will encode the desired rib operon. The DNA may be cleaved at specific sites using various restriction enzymes. Alternatively, one may use DNase in the presence of manganese to fragment the DNA, or the

DNA can be physically sheared, as for example, by sonication. The linear DNA fragments can then be separated according to size by standard techniques, including but not limited to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis and density gradient centrifugation.

Once the DNA fragments are generated, DNA libraries are prepared using an appropriate cloning and/or expression vector. A large number of vector-host systems known in the art may be used. Possible vectors include, but are not limited to, plasmids or modified viruses, but the vector system must be compatible with the host cell used. For *E. coli* such vectors include, but are not limited to, bacteriophages such as λ derivatives, high-copy plasmids such as pBR322 or pUC plasmids, or low-copy plasmids derived from *Pseudomonas* plasmid RK2. For *Bacillus* such vectors include, but are not limited to, bacteriophages such as ϕ 11 Dean et al., *J. Virol.* 20 : 339, 1976; Kawamura et al., *Gene* 5 :87, 1979) or Δ 105 derivatives (Iijima et al., *Gene* 9 :115, 1980; Errington, J. *Gen. Microbiology* 130 :2615, 1984; Dhaese et al., *Gene* 32 : 181, 1984; Errington, J. in *Bacillus Molecular Biology and Biotechnology Applications*, A.T. Ganesan and J.A. Hoch, eds. (Academic Press, New York,), p. 217, 1986), high-copy plasmids such as pUB110 (Ehrlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74 : 1680, 1977) or PBD64, or low-copy plasmids such as pE194 derivatives (Gryczan, T.J. in *The Molecular Biology of the Bacilli*, D.A. Dubnau, ed. (Academic Press, New York), pp. 307-329, 1982; Horinouchi and Weisblum, *J. Bacteriol.* 150 : 804, 1982). Recombinant molecules can be introduced into host cells via transformation, transfection, protoplasting, infection, electroporation, etc.

Once the DNA libraries are generated, identification of the specific clones harboring recombinant DNA containing the rib operon may be accomplished in a number of ways (as described, for example, in Maniatis et al., *supra*). For example, if an amount of the operon or a fragment thereof is available from another bacterial source (e.g., from *E. coli*) and is sufficiently homologous to the riboflavin biosynthetic genes of *Bacillus* to hybridize thereto, that DNA can be purified and labeled, and the generated bank of DNA fragments may be screened by nucleic acid hybridization to the labeled probes (Benton, W. and Davis, R., 1977, *Science* 196 :180; Grunstein, M. and Hogness, D., 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 :3961). Alternatively, sequences comprising open reading frames of the endogenous rib operon, or subsequences thereof comprising about 10, preferably 15 or more nucleotides, may be used as hybridization probes. Such probes can be made synthetically, based on a portion of the nucleic acid or amino acid sequence (examples of which are provided below) of a gene product known to be encoded by the operon ("reverse genetics"). If a purified rib operon-specific probe is unavailable, cloned gene libraries of restriction fragments (from partial *Sau*3A-digests, for example) can be made in bacteria, especially *B. subtilis* or *E. coli*, and the rib operon-containing recombinant clones can be identified by either marker-rescue or complementation of known rib mutations.

In a preferred embodiment, the rib operon of *B. subtilis* can be isolated for use from an *E. coli* plasmid library of *B. subtilis* DNA. In particular, and as described below, the *B. subtilis* rib operon can be isolated by virtue of its homology to a radiolabeled, synthesized nucleotide probe that is derived from an internal region of a gene product known to be encoded by the operon of *B. subtilis*. Although a portion of the amino acid sequence for β -riboflavin synthase (Ludwig et al., *J. Biol. Chem.* 262 :1016, 1987) can be the basis for such a probe, with the third nucleotide of each codon estimated from frequency of codon usage, a similar probe based on another region of this protein or another protein from the rib operon can be utilized and would fall within the scope of the present invention. The present invention further enables screening by use of synthetic probes which are derived from the nucleic acid sequence shown in Fig. 3.

Analogous methods to those detailed here can be used to isolate the rib operon of other bacteria, especially other *Bacilli* or *E. coli*. In a specific embodiment, such clones can be selected by assay for ability to hybridize to the labeled *B. subtilis* rib operon or a hybridizable portion thereof. It is well known in the art that starting from an appropriate mRNA preparation, cDNA can be prepared; such cDNA can also be used in accordance with the present invention to prepare vectors for the transformation of appropriate bacteria for riboflavin overproduction.

Once the host cells with recombinant DNA molecules that include the isolated rib operon or a portion thereof are identified, the DNA may be obtained in large quantities. This then permits the rib operon to be manipulated and its nucleotide sequence to be determined using various cloning and sequencing techniques familiar to those knowledgeable in the art.

For example, insertional mutagenesis can be used to locate and characterize the rib operon and genes thereof within a cloned piece of DNA. In a specific embodiment, rib-biosynthetic containing regions can be identified by inserting small cat (chloramphenicol acetyltransferase)-containing restriction fragments into several different restriction enzyme sites of the cloned DNA, and testing each derivative for insertional inactivation of riboflavin biosynthesis in an appropriate host (see below).

The cloned DNA corresponding to the rib operon can be analyzed by methods including but not limited to Southern hybridization (Southern, E.M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98 :503-517), Northern hybridization (see e.g.,

Freeman et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 :4094-4098), restriction endonuclease mapping (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), and DNA sequence analysis. Restriction endonuclease mapping can be used to roughly determine the genetic structure of rib operon. Restriction maps derived by restriction endonuclease cleavage can be confirmed by DNA sequence analysis.

DNA sequence analysis can be performed by any techniques known in the art, including but not limited to the method of Maxam and Gilbert (1980, Meth. Enzymol. 65 :499-560), the Sanger dideoxy method (Sanger, F., et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 :5463), or use of an automated DNA sequenator (e.g., Applied Biosystems, Foster City, CA). As an example, the DNA sequence of the rib operon of *B. subtilis* is presented in Figure 3.

Once the nucleotide sequence of the rib operon has been determined, putative open reading frames (ORFs) can then be identified along with the deduced amino acid sequence of their encoded product. Actual identification of the encoded product can be carried out, e.g., by performing S-30 coupled in vitro transcription/translation reactions, with various ORFs used as templates. Various mutational derivatives of the ORFs can also be tested for activity in functional assays of the S-30 reaction products, in order to test the function of the encoded products.

In a specific embodiment of the invention relating to the *B. subtilis* rib operon, and detailed in the examples below, the above-described methods were used to determine that *B. subtilis* riboflavin biosynthesis is controlled by a single operon of approximately 4.2 kb containing five biosynthetic genes: the β subunit of riboflavin synthase and ORFs designated 2, 3, 4, and 5 (see Figure 4). ORFs 2, 3, 4, and 5 were subsequently shown to encode proteins with molecular weights of about 15 kd, 47 kd, 26 kd, and 44 kd, respectively. As described below, ORF 5 was shown to encode a putative rib-specific deaminase that catalyzes the reduction of a deaminated pyrimidine to a ribitylamino-linkage in an early step in riboflavin biosynthesis. Our data also indicated that ORF 4 encodes the α subunit of riboflavin synthase and ORF 3 encodes a GTP cyclohydrolase, while ORF 2 possibly encodes a rib-specific reductase. ORF 1 and ORF 6 were found to be outside the primary transcription unit of the rib operon. The primary site for initiation of transcription of the rib operon was determined to be probably the apparent σ^A promoter located 290 bp upstream from the first gene in the operon, ORF 5 (Figure 4, P₁). The coding regions, promoters and transcription termination sites of the *B. subtilis* rib operon are shown in Table VI below.

The present invention encompasses the nucleotide and amino acid sequences of the genes of the rib operon, as well as subsequences thereof encoding functionally active peptides, and sequences which are substantially the same as such sequences. A functionally active peptide, as used herein, shall mean a protein or peptide which is capable of catalysing a reaction leading to riboflavin biosynthesis. A functionally active nucleic acid sequence shall mean a sequence capable of regulating riboflavin biosynthesis. A sequence substantially the same as another sequence shall mean a sequence capable of hybridizing to the complementary sequence thereof. In addition, a nucleic acid sequence not naturally controlling the expression of a second nucleic acid sequence shall mean a sequence which does not control the expression of the second sequence in the bacterium from which the second sequence is isolated.

Once the genetic structure of the rib operon is known, it is possible to manipulate the structure for optimal use in the present invention. For example, the rib operon can be engineered to maximize riboflavin production.

Depending on the host-vector system utilized, any one of a number of suitable transcription and translation elements may be used. Promoters produced by recombinant DNA or synthetic techniques may also be used to provide for transcription of the inserted sequences. When propagating in bacteria the regulatory sequences of the rib operon itself may be used. In an embodiment in which the entire rib operon, or greater than one gene thereof, is desired to be expressed as a polycistronic message, a prokaryotic host is required. In an embodiment in which a eukaryotic host is to be used, appropriate regulatory sequences (e.g., a promoter) must be placed in the recombinant DNA upstream of each gene/ORF that is desired to be expressed.

Specific initiation signals are also required for efficient translation of inserted protein coding sequences. These signals include the initiation codon (ATG, GTG or TTG) and adjacent sequences, such as the ribosome binding site (RBS). It should be noted that the RBS of a given coding sequence can be manipulated to effect a more efficient expression of that coding sequence at the translational level. In cases where an entire open reading frame of the rib operon, including its own initiation codon and adjacent regulatory sequences, is inserted into the appropriate expression vectors, no additional translational control signals may be needed. However, in cases where only a portion of the coding sequence is inserted, or where the native regulatory signals are not recognized by the host cell, exogenous translational control signals, including the initiation codon, must be provided. The initiation codon must furthermore be in phase

with the reading frame of the protein coding sequences to ensure translation of the entire insert. These exogenous translational control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic.

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the rib operon gene(s) or modifies and processes the gene product(s) thereof in the specific fashion desired. Expression from certain promoters can be elevated in the presence of certain inducers; thus, expression of the genetically engineered rib operon proteins may be controlled. In one embodiment, the regulatory regions of the operon, such as the promoter and the termination/ anti-termination regulatory sequences, can be manipulated or replaced with constitutive or growth-regulated promoters to deregulate the rib operon and thus increase riboflavin production. Furthermore, appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the desired modification and processing of the expressed proteins. Many manipulations are possible and within the scope of the present invention.

In one specific embodiment of the invention, the 5' regulatory sequence of the *B. subtilis* rib operon can be removed and replaced with one or more of several *B. subtilis* promoters; such a construction will cause high-level expression of the rib biosynthetic genes. This approach would involve the introduction of new restriction sites within a 20-30 bp region between the end of the transcription terminator and the RBS sequence of the first gene in the operon ORF 5. Such restriction sites can be introduced by either site-directed mutagenesis or by deleting all regulatory sequences upstream from the right-most *Bgl*III (*Bgl*III_R) site located within the first 30 bp of ORF 5 (see Figures 3 and 4) and inserting at this site a synthetic oligonucleotide that finishes off the 5' end of ORF 5 (including the ribosomal-binding site) and contains new upstream restriction sites. Once these constructions are made, promoter-containing restriction fragments with ends compatible to the new restriction sites can be introduced, causing expression of the rib genes under the control of the new promoter. Both constitutive and growth-regulated *B. subtilis* promoters can be used, including but not limited to strong promoters from the lytic bacteriophage SPO genes, *veg*, *amy* (*amylase*), and *apr* (*subtilisin*).

In another aspect of the invention, rib operon DNA fragments which have transcriptional regulatory activity (e.g., promoters) can be used to regulate the expression of heterologous gene products.

According to the present invention, the rib operon can be introduced into bacteria, including for example, *Bacilli* and *E. coli*, where it is expressed. In a preferred embodiment, the bacterial host is one of the mutant hosts described above. In a specific embodiment, the cloned rib operon is integrated into the host chromosomal DNA, where it is replicated and expressed along with host genomic DNA. In a most preferred embodiment, multiple copies of the rib operon are integrated into the host chromosomal DNA, thus providing for amplified expression of the rib operon in the deregulated host. One method in which this may be accomplished is chromosomal insertion of a cat-containing rib operon followed by chloramphenicol amplification of the operon, as detailed in the examples sections *infra*. One can also use a *tet*' gene, or certain other drug resistance genes that are expressed in *Bacillus*, with the same technique.

In specific embodiments, integration vectors containing the rib operon fragment can be engineered so as to contain the rib operon on the smallest possible DNA fragment, in an attempt to obtain greater amplification of the vector within the host chromosome. For example, vector DNA sequences may be deleted, and/or nonessential DNA flanking the rib operon can be deleted.

In general, bacteria that are prototrophic for riboflavin survive on minimal medium in the absence of riboflavin. Production of riboflavin can be detected and quantified by various methods. In a preferred embodiment, overproduction of riboflavin is readily observed when overproducing bacteria are exposed to UV light at 366 nm, as described *infra*, producing an observable, yellow fluorescence. For example, many of the engineered plasmids of the present invention are produced in *E. coli*. For some of these plasmids, overproduction of riboflavin has been confirmed by this method. The amount of riboflavin produced can be quantitated, e.g., with reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC). Cell-free supernatants from bacteria can be fractionated over an HPLC column, as described *infra*, and monitored for riboflavin at 254 nm. By extrapolation from a standard curve, the concentration of riboflavin can be determined by the area of the peak on the chromatogram.

Riboflavin can also be quantitated by fluorescence spectrophotometry. For example, samples containing riboflavin can be read in a fluorescence spectrophotometer set at an emission wavelength of 525 nm and an excitation wavelength of 450 nm.

In addition, other methods known in the art are available to detect or quantitate riboflavin based on its physical and biological properties.

Riboflavin overproducing bacteria can be grown in vessels ranging from shake flasks to large "batch" fermentors, by methods known in the art (see below). In a preferred embodiment, nutrient feed can be manipulated to maximize riboflavin production at the minimum cost by varying the nutrients in the medium.

In a specific embodiment, amplified rib -containing genes can be maintained at high-copy number in the bacterial chromosome by the inclusion of about 60 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol in the inoculum seed strain (but not necessarily in the fermentor). Chemap 14-liter fermentors can be used at 1000 rpm with a head pressure of 0.6 atmospheres. To achieve a high cell density, various carbon sources such as, for example, glucose, sucrose, citric acid cycle acids, maltose or starch, and various nitrogen sources such as yeast extract, corn steep liquor, ammonia and/or protein hydrolysates can be used. It is, however, essential to add parts of these media ingredients in such a way that limitations unfavorable to riboflavin production (e.g., oxygen starvation resulting from too high a carbon source concentration) are avoided. Fermentation media and conditions suitable for use are detailed below.

Examples

Example 1: Riboflavin-Overproducing *B. subtilis* Mutants

We describe in the examples herein the production of strains of *Bacillus subtilis* which overproduce riboflavin. In order to accomplish this, we used classical genetics, genetic engineering, and fermentation. Classical genetics with selection using purine and riboflavin analogs was used to deregulate the pathways for purine (riboflavin precursor) and riboflavin biosynthesis. Riboflavin production was increased further by cloning and engineering the genes of the riboflavin biosynthetic pathway (the rib operon), allowing for constitutive, high-level production of rate-limiting biosynthetic enzyme(s).

The biosynthesis of riboflavin in *B. subtilis* originates with GTP (Figure 1). To obtain a host that overproduces riboflavin we used classical genetics to both increase the amount of GTP that the cell produces and to deregulate the riboflavin pathway. Purine overproduction in *B. subtilis* can be achieved by obtaining mutants resistant to purine analogs such as azaguanine and decoyinine, and other antagonists such as methionine sulfoxide (see e.g., Ishii and Shio, *Agric. Biol. Chem.* **36** (9) :1511-1522, 1972; Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.* **43** (8) :1739-1744, 1979). The riboflavin pathway can be deregulated by obtaining mutants resistant to the riboflavin analog roseoflavin (Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.* **46**(8) :2003-2008, 1982). Roseoflavin-resistant strains were selected from several strains which had been previously mutagenized and which were resistant to several purine analogs. Described below are the methods used to produce a strain (RB50) which overproduces riboflavin.

8-Azaguanine-Resistant Mutants

B. subtilis is effectively killed by the purine analogue 8-azaguanine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at a concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$, and resistant mutants appear spontaneously at a frequency of less than 1 in 10^8 . Ethyl methyl sulfonate (EMS; Sigma) at 30 $\mu\text{g/ml}$ was used as a mutagen to increase the frequency of azaguanine-resistant (Ag^r) mutations. Mutagenesis was performed on cells from *B. subtilis* strain 168 by standard procedures (Miller, 1972, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). After plating 4×10^6 mutagenized cells on minimal medium (Sloma et al., *J. Bact.* **170** :5557, 1988) containing 500 $\mu\text{g/ml}$ azaguanine and restreaking for single colonies, 35 Ag^r colonies resulted. One mutant, RB11 (Ag^r -11), was used in the construction of RB50.

Decoyinine-Resistant Mutants

Decoyinine-resistant (Dc^r) mutations were obtained spontaneously at a frequency of 1 in 10^6 or after EMS mutagenesis at 1 in 10^5 by plating cells on minimal medium containing 100 $\mu\text{g/ml}$ of decoyinine (Upjohn Co., Kalamazoo, MI). A Dc^r mutant of RB11 was obtained by mutagenesis with EMS as described above. One Dc^r colony, RB15 (Ag^r -11, Dc^r -15), was used in the construction of RB50.

Transfer of the Ag and Dc Mutations

These purine analog-resistant mutations were transferred to a different strain background in order to

isolate them from any unwanted EMS-induced mutations and to verify that the Ag^r and Dc^r mutations were due to single loci. Since part of the "carbon flow" from inosine monophosphate (IMP), a riboflavin precursor, is also used for adenine nucleotide biosynthesis, a host strain was selected that was blocked in the adenosine monophosphate (AMP) pathway via the mutation pur-60, allowing more carbon material to "flow" from IMP to the guanine nucleotide precursors of riboflavin (Figure 2). *B. subtilis* strain 1A382 (hisH2, trpC2, pur-60) was made competent (Sloma et al., J. Bact. 170 :5557 (1988)) and transformed (by the method of Gryczan et al., J. Bact. 134:318 (1978)) with total DNA prepared from the Ag^r/Dc^r mutant RB15. The Trp⁺ (tryptophan) revertant colonies were selected, with 3.3% (10/300) of those also being Dc^r and 2.3% (7/300) Ag^r. This result was not unexpected since, due to "congression" (transformation of a second unlinked marker), a number of the Trp⁺ colonies should also be resistant to decoyinine or azaguanine.

One Dc^r colony, RB36 (his H2, pur-60, Dc^r-15), one Ag^r colony, RB40 (his H2, pur-60, Ag^r-11), and one Dc^r/Ag^r colony (which was also found to be his⁺), RB39 (pur-60, Ag^r-11, Dc^r-15), were all selected for further study.

Methionine Sulfoxide-Resistant Mutants

Selection using high levels of methionine sulfoxide (MS; 10 mg/ml, Sigma) resulted in spontaneous mutants appearing at a sufficiently high frequency that mutagenesis with EMS was not necessary. The Ag^r/Dc^r mutant, RB39, was streaked onto minimal medium containing 10 µg/ml MS. Resistant colonies were obtained and were restreaked for single resistant colonies. One strain, RB46 (pur-60, Ag^r-11, Dc^r-15, MS^r-46) was selected for further study.

Roseoflavin Resistant Mutants

Although many of these Ag^r, Dc^r and MS^r mutants were likely to be overproducing GTP, none of them produced levels of riboflavin detectable on plates. In order to deregulate the riboflavin biosynthetic pathway, conditions were determined to select for resistance to the riboflavin analog roseoflavin (Toronto Research Chemical). Maximum killing of cells occurred at 100 µg/ml of roseoflavin in minimal or complete medium; increasing the concentration did not result in any additional killing. Mutations to roseoflavin resistance (RoF^r) spontaneously occurred at a sufficiently high rate (approximately 5×10^{-5}) such that mutagenesis with EMS or other chemicals was not necessary.

Approximately 1000 RoF^r colonies were obtained from each of the strains described above, 1A382, RB36, RB39, RB40 and RB46. RoF^r mutants from all of these strains showed a low level of fluorescence on minimal media plates when exposed to long-wave UV light (366 nm), indicating some riboflavin production. One of the RoF^r colonies obtained from RB46, RB46Y (pur-60, Ag^r-11, Dc^r-15, MS^r-46, RoF^r-46), when grown on minimal medium, produced 14 mg/l of riboflavin as determined by HPLC (described above).

Of all the strains treated, only RB39 and RB46 produced a significantly different phenotype when RoF^r colonies were selected. Approximately 0.5% to 1.0% of the RoF^r colonies of either RB39 or RB46 produced an intensely fluorescent, yellow colony. Of these colonies, RB51 (pur-60, Ag^r-11, Dc^r-15, RoF^r-51), arising from RB39, and RB50 (pur-60, Ag^r-11, Dc^r-15, MS^r-46, RoF^r-50), arising from RB46, produced a stable, fluorescent-yellow phenotype which correlated with a higher level of riboflavin production, as determined by HPLC. When grown in minimal medium, both RB50 and RB51 produced higher levels of riboflavin in their supernatants than the other RoF^r strains, about 40 mg/l and 30 mg/l, respectively. The lineage of RB50 is depicted in Figure 5.

Because intensely fluorescent (and thus riboflavin overproducing) colonies could be obtained in non-MS^r strains such as RB51, it appeared that this mutation in general might not be contributing significantly to the higher production phenotype. Both of the other mutations, Ag^r and Dc^r (Ag^r-11 and Dc^r-15 in RB39), appear to be necessary to produce high levels of riboflavin since no intensely fluorescent RoF^r colonies could be found in strains containing only the Ag^r-11 (from RB40) or Dc^r-15 (from RB36) mutation alone.

guaC Mutations

Another possibly important mutation for achieving overproduction of GTP, and thus riboflavin, is guaC3, which prevents the conversion of GMP back into IMP (see Figure 2). To construct a strain containing guaC3 that overproduces riboflavin, competent *B. subtilis* strain 62121 cells (guaC3, trpC2, metC7) (Endo et al., J.

Bact. 15 : 169, 1983) were transformed with RB50 DNA and selected for Dc^r on plates containing 100 µg/ml of decoyinine. Thousands of Dc^r colonies resulted. Of 200 colonies which were patched onto Dc^r plates, one was found that exhibited the riboflavin overproduction phenotype (based on UV fluorescence), and was RoF^r. This colony was designated RB52 (guaC3, trpC2, metC7, Dc^r-15, RoF^r-50) and was reserved for subsequent study.

Other Analog-Resistant Mutants

Finally, because mutants resistant to several additional purine analogs also have been reported to be altered in purine metabolism, such mutations were assayed in order to investigate their effect on riboflavin-overproducing strains. It was determined that 500 g/ml of 8-azaxanthine, 1 mg/ml of 6-thioguanine, or 2 mg/ml of sulfaguanidine (Sigma) effectively kills wild-type *B. subtilis*. The azaguanine-resistant, riboflavin-overproducing strains RB50::[pRF8]₉₀ and RB53::[pRFB]₉₀ (see below) were found to be already resistant to azaxanthine. Although separate azaguanine- and azaxanthine-resistant mutations with different properties have been described previously, in this case the Ag^r-11 and Ag^r-53 mutations appear to also convey azaxanthine resistance.

HPLC Analysis of riboflavin in crude supernatants of *B. subtilis*

Accumulation of riboflavin in *B. subtilis* cultures was quantitated by reverse-phase HPLC. Riboflavin standards (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) or cell-free supernatants from strains to be tested were fractionated over a 4.6 mm x 250 mm Vydac C₁₈ column equilibrated with 1% ammonium acetate (pH 6.0). At injection, the column was developed with a linear gradient of methanol and monitored for riboflavin at 254 nm. Authentic riboflavin (i.e. riboflavin "standard") elutes at the mid-point of the gradient.

Example 2: Cloning *B. subtilis* rib operon

Our general strategy to isolate a restriction fragment containing the rib operon was to screen a "mini" *E. coli* plasmid library of *B. subtilis* DNA by hybridization with a synthetic oligonucleotide probe, the DNA sequence of which was partially derived from the published amino acid sequence for the β subunit of riboflavin synthase (Ludwig et al., J. Biol. Chem. 262 :1016, 1987). A summary of the protocol is presented in Figure 6.

A synthetic, 54-base "guess-a-mer" oligonucleotide probe was used for this screening based on amino acids 84-102 of the 240 amino acid riboflavin synthase protein, sequenced by Ludwig et al. (J. Biol. Chem. 262 :1016-1021, 1987). The third nucleotide of each codon in the probe was chosen according to estimates made of the most frequent codon usage of *B. subtilis*, based upon, for example, some of the sequences available in GenBank® (Los Alamos Nat. Lab, Los Alamos, NM). The probe consisted of the following sequence:

5'-GGAGCTACAACACATTATGATTATGTTTGCAATGAAGCTGCTAAAGGAATTGCT-3'.

To test the specificity of the probe, the ³²P-labelled 54-mer DNA was hybridized to nylon filters containing EcoRI-digested chromosomal DNA (Southern, J. Mol. Biol. 98 :503, 1975) isolated from wild-type and the mutant *B. subtilis* strains. The probe strongly hybridized to a single 9-10 kb fragment of EcoRI-digested *B. subtilis* (ribs⁺ met⁻) DNA, which is in good agreement with the predicted size of the rib-containing fragment (Osina et al., FEBS. Lett. 196 :75, 1986). A labelled fragment of the identical size was detected when the probe was hybridized to two mutant strains, RB46 (pur-60, Ag^r-11, Dc^r-15, MS^r-46) and RB50 (pur-60, Ag^r-11, Dc^r-15, MS^r-46, RoF^r-50), the latter being a riboflavin overproducer. These hybridization experiments were repeated using HindIII-cut chromosomal DNA, which resulted in the probe identifying a smaller, single fragment of approximately 1.8 kb; this latter result was useful in determining the general location of the rib biosynthetic operon within the cloned DNA.

Isolation of Plasmids pRF1, pRF2 and pRF3, Containing Wild-type rib Biosynthetic Genes

A "mini" gene library of 9-11 kb EcoRI fragments from *B. subtilis* strain 168 (ribs⁺) DNA was prepared using pRK290, a low-copy number vector derived from the *Pseudomonas* replicon RK2 (Ditta et al., Plasmid

13 :149, 1985). EcoRI fragments (size 9-11 kb) of *B. subtilis* (rib⁺ met⁻) DNA were isolated by sucrose (10-40%) rate-zonal centrifugation. A four-fold excess of these fragments (0.22 µg) was ligated to EcoRI-cut pRK290 (0.26 µg), that had been dephosphorylated with calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP), at a total DNA concentration of 10 µg/ml. Approximately 10 ng of ligated DNA was transformed into *E. coli* DH5 (F⁻, endA1, hsdR11 [r_k⁻, m_k⁺], supE₄₄, thi-1, λ⁻, recA1, gyrA96, relA1), resulting in tetracycline-resistant (Tc^r) colonies at a frequency of 7.7 × 10⁴/ µg of DNA. To determine the fraction of transformants containing insert DNA of 9-11 kb, plasmid mini-lysates were prepared from several Tc^r transformants, and their DNA was analyzed by restriction enzyme digestion. About 40% of the Tc^r transformants were found to contain single EcoRI-generated inserts of 9-11 kb.

Approximately 1140 of the Tc^r colonies were screened with the ³²P-labelled 54-mer probe specific for the riboflavin synthase gene. One colony gave a positive signal. Plasmid DNA, designated pRF1, was isolated from this clone and tested for Rib⁺-marker rescue activity by transforming the DNA into *B. subtilis* 1A210 that contains the riboflavin-deficient mutation rib-2, and selecting for Rib⁺ prototrophic colonies. pRF1 transformed 1A210 to Rib⁺ prototrophy at a high frequency. Plasmid DNA from a randomly chosen Tc^r transformant failed to rescue this marker.

Restriction enzyme analysis revealed that pRF1 actually contained two EcoRI-fragment inserts, of 10 kb and 11 kb. To determine which fragment contained the rib operon, EcoRI-digested pRF1 was probed with the ³²P-labelled, 54-mer riboflavin synthase probe. The results indicated that only the smaller, 10 kb fragment cross-reacted with the probe. Moreover, when the 10 kb EcoRI fragment was recloned into the EcoRI site of pBR322, recombinant plasmids pRF2 and pRF3 resulted, representing the two possible orientations of insertion. Both plasmids were found to rescue the rib-2 mutation of *B. subtilis* 1A210 to prototrophy at a high frequency.

Isolation of Plasmids pRF6 and pRF7 Containing rib Biosynthetic Genes From RoF^r-*B. subtilis* Strain RB50

RB50 is one of the RoF^r mutants of *B. subtilis*, produced as described above, that is deregulated for riboflavin biosynthesis. It has been reported that approximately 80% of RoF^r mutations reside within the rib operon at the rib0 locus (Stepanov, et al., Genetika (USSR) 13 :490, 1977). Like the wild-type rib operon, rib genes in RB50 were also contained on a 9-10 kb EcoRI fragment; thus this fragment was cloned using the protocol outlined in Figure 6, with pBR322 used as the cloning vector. Size-selected 9-11 kb EcoRI fragments (0.1 µg) from RB50 were prepared as before and ligated to a two-fold excess of ends of EcoRI-cut, dephosphorylated pBR322 DNA (0.34 µg) at a total DNA concentration of 22 µg/ml. Approximately 9 ng of ligated DNA was transformed into *E. coli* DHS, resulting in ampicillin-resistant (Ap^r) colonies at a frequency of 3.5 × 10⁵/µg of DNA.

Restriction enzyme analysis of plasmid DNA isolated from a sampling of 12 Ap^r colonies revealed that 50% contained plasmids with 9-11 kb EcoRI inserts. Approximately 1140 Ap^r colonies were screened with the ³²P-labelled 54-mer probe specific for the riboflavin synthase gene by colony hybridization. Six colonies gave positive signals. Plasmids pRF6 and pRF7, isolated from two of these six colonies, were identified by restriction enzyme analysis as containing inserts with the same orientation as pRF2 and pRF3, respectively. In addition, both plasmids were able to marker-rescue the rib-2 mutation at high frequencies.

Example 3: Introducing rib⁺ DNA Into *B. subtilis*

As described supra, the rib operon from both a wild-type strain and a RoF^r mutant of *B. subtilis* were cloned as identical 10 kb EcoRI fragments into the EcoRI site of the *E. coli* replicon pBR322; the derivation of these recombinant plasmids is schematically diagrammed in Figure 6. To introduce the 10 kb EcoRI fragment containing the rib operon into *B. subtilis* in multiple copies, and thus further increase riboflavin production, we constructed a plasmid vector which would allow integration into the *B. subtilis* chromosome. The integrated DNA was amplified by selecting colonies that would grow at high drug concentrations of chloramphenicol.

Construction of and Transformation with Integrational rib Plasmids pRF4 and pRF8

To construct the integrational vector, the drug-resistance gene chloramphenicol acetyltransferase (cat), which is selectable in *B. subtilis*, was introduced into pRF2 and pRF6, the pBR322 vectors with the 10 kb

fragment from wild-type or RoF^r *B. subtilis* strains, respectively. The plasmids pRF2 and pRF6 were digested with BamHI, which cuts the plasmids uniquely within the pBR322 sequence, and dephosphorylated with CIAP. The cleaved DNA was ligated to a 1.3 kb BamHI fragment containing the cat gene (Youngman et al., Plasmid 12 : 1-9, 1984), and the ligated DNAs then transformed into *E. coli* DHS cells (Hanahand, J. Mol. Biol. 166 : 557, 1983). Approximately 80-90% of the Ap^r transformants were chloramphenicol resistant (Cm^r); restriction analysis of the isolated plasmids (Maniatis et al.) confirmed that plasmid DNA from the Cm^r colonies contained the 1.3 kb fragment. The plasmid containing the wild-type riboflavin fragment and the cat gene was designated pRF4; the plasmid containing the cloned riboflavin fragment from the RoF^r strain was called pRF8. (Since the RoF^r mutation was subsequently shown to be outside the rib operon, these plasmids are presumably identical).

The plasmids pRF4 and pRF8 were transformed into four different *B. subtilis* strains: the riboflavin overproducer RB50 (Ag^r-11, Dc^r-15, MS^r-46, RoF^r-50), the RB50 parent RB46 (Ag^r-11, Dc^r-15, MS^r-46), the RB50 parent 1A382 and IS75, a common laboratory strain. Competent IS75 and 1A382 cells were transformed with pRF4 or pRF8; these same plasmids were introduced into RB46 and RB50 by transformation of protoplasts (Chang and Cohen, Mol. Gen. Genet 168 :111-115, 1979). The pRF4 or pRF8 DNA integrated into each of these four strains was amplified by selecting for colonies that grew at higher chloramphenicol concentrations. In each strain, we were able to obtain colonies that grew in up to 60 µg/ml of chloramphenicol.

In addition, RB52 (guaC3, trpC2, metC7 Dc^r-15, RoF^r-50), produced by transforming the guaC3 *B. subtilis* strain 62121 with DNA from RB50, was made competent and transformed with pRF8. The integrated plasmid in one of the many Cm^r colonies that resulted was amplified using 90 µg/ml of chloramphenicol. The resulting cells, RB52::[pRF8]₉₀, were grown to mid-log phase and plated on minimal media containing 500 µg/ml azaguanine. Approximately 20 Ag^r colonies resulted. One such colony seemed to produce a more intense fluorescence. The lineage of this strain, RB53::[pRF8]₉₀, is given in Figure 7.

Example 4: Riboflavin Overproduction by Strains Containing pRF4 or pRF8

RB50 containing pRF4 or pRF8 displayed the riboflavin overproduction phenotype (yellow and UV-fluorescent colonies). Amplification of the rib⁺ DNA in a wild-type strain or the parent strains of RB50 did not yield yellow or UV-fluorescent colonies, a finding that indicates that the RoF^r mutation (which deregulates the biosynthesis of riboflavin) is required for chromosomal amplification of wild-type DNA to cause riboflavin overproduction. A series of shake flask fermentations were performed in 25 ml of riboflavin minimal medium (RMM, in Table I) in a 300 ml baffled flask (Bellco) to measure the production of riboflavin from RB50 that contained the integrated and amplified rib operon.

TABLE I

| COMPOSITION OF MEDIA | |
|---|------|
| RMM | g/l |
| Sodium glutamate | 2.0 |
| Casamino acids (Difco) | 0.2 |
| Yeast extract (Difco) | 0.2 |
| KH ₂ PO ₄ | 6.0 |
| K ₂ HPO ₄ | 14.0 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2.0 |
| Sodium citrate | 1.0 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 |
| Adenosine | 0.05 |
| (adjusted to pH 7.0 and autoclaved) | |
| Maltose | 15.0 |
| (added as sterile 20% solution after autoclaving) | |

The fermentations were run with strains RB46, RB50 and RB50 containing pRF4 amplified by selection for resistance to 30 µg/ml of chloramphenicol (RB50::[pRF4]₃₀) and 90 µg/ml of chloramphenicol (RB50::[pRF4]₉₀). At 24 and 48 hours, supernatant samples were removed and measured for riboflavin content by reverse-phase HPLC.

As shown in Table II, RB50::[pRF4]₃₀ produced 0.3 g/l of riboflavin, and RB50::[pRF4]₉₀ produced 0.7 g/l of riboflavin, in 48 hours, which is significantly more than that produced by the strains without rib amplification, such as RB46 and RB50.

TABLE II

| QUANTITATIVE ANALYSIS OF RIBOFLAVIN-CONTAINING SUPERNATANTS FROM B. SUBTILIS | | |
|--|-------------------------|----------------------|
| Strain | Culture Time (hours) | Riboflavin* (g/l) |
| RB46 | 24 | 0.009 |
| RB50 | 24 | 0.02 |
| RB50::[pRF4] ₃₀ | 24 | 0.1 |
| RB50::[pRF4] ₉₀ | 24 | 0.4 |
| RB46 | 48 | 0.007 |
| RB50 | 48 | 0.05 |
| RB50::[pRF4] ₃₀ | 48 | 0.3 |
| RB50::[pRF4] ₉₀ | 48 | 0.7 |

* Riboflavin was measured using an HPLC assay.

The dramatic increase in riboflavin production resulting from amplification of rib genes in the de-regulated host argues that information encoded by the cloned DNA is rate-limiting for riboflavin biosynthesis.

Example 5: Mapping the RoF⁻50 Mutation

The RoF⁻50 mutation in RB50 appeared to be critical to the riboflavin-overproduction phenotype. To identify and possibly move the mutation into different strain backgrounds it was necessary to map the location of the RoF⁻50 mutation on the B. subtilis chromosome. Since pRF4 and pRF8 gave very similar levels of riboflavin production in all strain backgrounds, it seemed unlikely that the RoF⁻50 mutation was located on the cloned 10 kb EcoRI, rib-containing fragment. More likely, the RoF⁻50 mutation is an unlinked repressor-type mutation, possibly in ribC, a repressor mutation which has been reported to map in the lys-aroD region of the B. subtilis chromosome (Chernik et al., Genetika (USSR) 15 :1569, 1979). To determine whether the RoF⁻50 mutation was linked or unlinked to the riboflavin operon, competent B. subtilis 1A210 (rib-2) cells were transformed with RB50 DNA, selecting for rib⁺. Thousands of rib⁺ colonies resulted, and 200 colonies were patched onto tryptose blood agar base containing 100 g/ml of roseoflavin. No RoF⁺ colonies resulted, and none of the colonies exhibited the riboflavin overproduction phenotype, confirming that the RoF⁻50 mutation is not located in the rib operon.

Example 6: Locating rib⁺ Biosynthetic Genes Using CAT Insertional Mutagenesis

Figure 4 contains a restriction map of the rib-containing 10 kb EcoRI fragment of pRF2, prepared according to standard procedures. Restriction enzyme sites for XbaI, BglII, SstI, HpaI and NcoI are unique to the insert DNA, whereas SalI and PstI cut once in the insert and once in the vector; the insert does not contain any BamHI, XhoI or NheI restriction sites. Restriction enzyme HindIII cleaves the insert at multiple sites; the 54-mer probe specific for the riboflavin synthase gene hybridized to an approximately 1.8 kb HindIII fragment, suggesting that the rib operon must also reside in the general area surrounding the SalI

and left-most BglII (BglII_L) sites.

In general, to determine the boundaries of the rib operon, small cat-containing restriction fragments were used to construct insertions and deletions in the rib⁺-cloned DNA fragment of pRF2. E. coli plasmid pEccl served as the primary source of restriction fragments bearing a cat gene which confers chloramphenicol-resistance in both E. coli and B. subtilis. This plasmid, a derivative of pMI1101 (Youngman et al., Plasmid 12, 1-9, 1984) in which a non-essential region of the plasmid was removed by standard recombinant DNA techniques, contains a 1.3 kb cat-containing fragment flanked by the "polylinkers" of M13mp7, and therefore is capable of generating cat cassettes with either SmaI, EcoRI, Sall or BamHI ends. To generate SstI or XbaI-ended fragments containing the cat gene, the 1.3 kb cat-containing BamHI fragment of pEccl was isolated, the ends modified with HindIII linkers, and the modified fragment cloned into the HindIII site within the polylinker region of pIC2OR, generating plasmid pEcc4.

Integrative plasmid derivatives were first constructed in E. coli and then transferred to the rib chromosomal locus of B. subtilis by DNA transformation. This was done by linearizing the plasmid by a restriction enzyme cut outside the cloned DNA insert, transforming competent B. subtilis strain 1A382 or PY79 (β^+ , rib⁺) cells with this cut DNA, and selecting for Cm^r. Because the pBR322 replicon is unable to replicate in B. subtilis, and the cat gene is bounded on both sides by sequences homologous to the rib⁺ locus, the cat-containing insertion or deletion can only be inserted into the chromosome by a double-crossover recombination event to yield Cm^r transformants. To determine whether the insertion or deletion inactivated riboflavin synthesis, Cm^r colonies were assessed for growth on minimal medium agar plates with or without the presence of riboflavin (Rib phenotype).

As diagrammed in Figure 8, cat-containing restriction fragments were inserted by ligation into the individual restriction sites for XbaI, SstI, Sall and BglII of pRF2, inserted between the pair of BglII or NcoI sites (generating deletions removing either a 2.0 kb BglII fragment or a 0.8 kb NcoI fragment) or inserted into single HaeIII and EcoRV sites of the approximately 1.8 kb HindIII fragment that hybridized to the rib-specific DNA probe, according to standard techniques. The results are shown in Table III.

TABLE III
CHARACTERIZATION OF INSERTION AND
DELETION DERIVATIVES OF rib[±] DNA

| 5 | <u>Insertion derivative</u> ^a | <u>B. subtilis</u> ^b <u>Riboflavin Phenotype</u> |
|----|--|--|
| | A(<u>Xba</u> I) | |
| | r | + |
| | l | ND |
| 10 | B(<u>Sst</u> I _L) | |
| | r | + |
| | l | ND |
| | C(<u>Sst</u> I _R) | |
| 15 | r | -- |
| | l | -- |
| | D(<u>Bgl</u> II _L) | |
| | r | -- |
| | l | -- |
| 20 | E(<u>Sal</u> I) | |
| | r | -- |
| | l | -- |
| | F(<u>Bgl</u> II _R) | |
| | r | -- |
| | l | -- |
| 25 | G(<u>Hae</u> III) | |
| | r | ND |
| | l | + |
| | H(<u>Eco</u> RV) | |
| 30 | r | + |
| | l | ND |
| | <u>Deletion derivative</u> | |
| 35 | Bgl | |
| | r | -- |
| | l | -- |
| | Nco | |
| | r | + |
| 40 | l | + |

a "r" (right) and "l" (left) identify the transcriptional orientation of the inserted cat gene relative to the restriction map in Figure 8.

b B. subtilis strain 1A382 (rib⁺, trpC2, pur-60, hisH2) or PY79 (SP β^c, rib⁺)

50 As summarized in Figure 8 and Table III, insertions into the Sall, either BglII, or the "right most" SstI (SstI_R) sites, or deletion of the 2.0 kb BglII fragment, all generated Cm^r colonies that could not produce riboflavin (Rib⁻), indicating that the rib operon was centrally located within the cloned DNA. Significantly, removal of the 0.8 kb NcoI fragment apparently had no effect on riboflavin production (Rib⁺), suggesting that one end of the rib gene cluster was located to the left of the "left most" NcoI (NcoI_L) site. The other end of the rib operon was initially determined to map within the approximately 1.8 kb HindIII fragment because the two
55 insertions at sites within the fragment, EcoRV and HaeIII, as well as sites distal to the fragment, XbaI and SstI_L, all generated Cm^r colonies that produced riboflavin.

Example 7: Nucleotide Sequence of the rib Operon

Based on the cat-insertional mutagenesis of the cloned 10 kb DNA fragment, the entire rib operon was localized within a 6.0 kb region bounded by the SstI_L and NcoI_L sites.

This 6.0 kb region of pRF2 containing the rib operon and flanking regions was sequenced by the dideoxy method of Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 :5463, 1977). Briefly, M13 clones for sequencing were prepared either by subcloning specific restriction fragments into M13, by using the exonuclease activity of T4 DNA polymerase to generate a series of overlapping deletions (Dale et al., Plasmid 13 :31, 1985), or by "shot-gun" cloning random fragments, from sonicated restriction fragments, into M13. In some cases, the nucleotide sequence across a restriction site juncture of adjacent fragments was also determined by primer extension sequencing. Approximately 5500 bp were sequenced on both strands and analyzed for sequences resembling typical open reading frames with gram positive-bacteria ribosome binding sites, gram-positive promoters and rho-independent transcription termination sites.

Analysis revealed six complete, non-overlapping open reading frames (Figure 3): ORF 2 (124 amino acids), the gene coding for the β subunit of riboflavin synthase (154 amino acids), ORF 3 (398 amino acids), ORF 4 (215 amino acids), ORF 5 (361 amino acids) and ORF 6 (105 amino acids). Each ORF was preceded by a strong *Bacillus* ribosome binding site (RBS) with calculated thermostability ranging from $\Delta G = -16$ to -22 kcal/mol, and all of them were oriented in the same transcriptional direction. In addition, within the coding region of ORF 5, a second RBS site and ATG start codon were identified, potentially encoding a smaller protein of 248 amino acids. However, based on S-30 in vitro coupled transcription/translation reactions (see below), ORF 5 appears to encode only a 361 amino acid protein. Finally, part of another coding region, ORF 1, encoding the last 170 amino acids of a protein and oriented in the opposite direction, was also identified.

Based on the following observations, riboflavin biosynthesis in *Bacillus* is controlled by a single operon containing 5 genes: the β riboflavin synthase gene, ORF 2, ORF 3, ORF 4, and ORF 5, of which at least four, the β -riboflavin synthase gene, ORF 3, ORF 4 and ORF 5, unambiguously encode biosynthetic enzymes, with the remaining one, ORF 2, possibly encoding a biosynthetic enzyme.

1. ORF 3, ORF 4 and ORF 5 overlap restriction enzyme sites where insertion of cat-containing restriction fragments caused inactivation of riboflavin production in *B. subtilis* (Figures 4 and 8).

2. ORF 1 overlaps a restriction enzyme site(s) where insertion of cat-containing restriction fragments did not cause inactivation of riboflavin production in a rib⁺ *B. subtilis* strain (Table III and Figure 8), nor did it cause reduction of riboflavin production in the deregulated, RoF^r *B. subtilis* strain RB52.

3. ORF 2 also overlaps a restriction enzyme site, EcoRV, where insertion of cat-containing restriction fragments did not cause inactivation of riboflavin production in a rib⁺ *B. subtilis* strain (Table III and Figure 8). However, such an insertion did cause a detectable reduction of riboflavin production in the deregulated, RoF^r *B. subtilis* strain RB52, indicating that the mutated ORF 2 gene product was partially inactive for riboflavin production. The results suggest that ORF 2 does encode a rib-specific enzyme.

4. Two DNA sequences capable of forming stem-loop structures indicative of rho-independent transcriptional termination sites were identified within the intercistronic gaps between ORF 1 and ORF 2 and between ORF 5 and ORF 6 (Figures 4 and 9). Removal of structures between ORF 5 and ORF 6 enhances expression of riboflavin. The structures impart riboflavin sensitivity to lacZ-fusion constructs; thus, they can be used to impart such sensitivity to any other gene to which they are fused at the 5'-end upstream of the promoter.

5. A DNA sequence, TTGCGT-(17bp)-TATAAT, resembling the promoter recognized by the σ^A - (vegetative form) of *B. subtilis* RNA polymerase was identified approximately 290 bp upstream from ORF 5, oriented in the same transcriptional direction as ORF 5 (Figure 4). A transcriptional fusion of this promoter (P₁, on a 1.1 kb BglIII-NcoI restriction fragment) to a promoterless *E. coli* lacZ gene (P₁-lacZ) displayed riboflavin-regulated expression of β -galactosidase activity in a rib⁺, *B. subtilis* strain (62121) and high-level, constitutive (unregulated) expression of β -galactosidase activity in a rib⁺, RoF^r *B. subtilis* strain (RB52) only when the promoter was oriented in the same transcriptional direction as the gene, as shown in Table IV. Primer extension analysis was used to confirm the start site. Transcriptional and Northern analyses were used to show a polycistronic RNA of 4.2 kb encompasses the entire rib operon.

TABLE IV

| RIBOFLAVIN-REGULATED EXPRESSION OF P ₁ -LacZ TRANSCRIPTIONAL FUSIONS | | |
|--|--|--------------|
| Strain (integrated plasmid) | β -Galactosidase Specific Activity (Miller Units) | |
| | + Riboflavin (2 μ g/ml) | - Riboflavin |
| B. subtilis 62121 (P ₁ - lac Z ^a) | 1.3 | 4.2 |
| B. subtilis RB52 (P ₁ - lac Z ^a) | 31 | 38 |
| B. subtilis 62121 (P ₁ - lac Z ^b) | <0.1 | <0.1 |
| B. subtilis 62121 | <0.1 | <0.1 |

^a P₁ and lac Z orientated in the same direction

^b P₁ and lac Z orientated in opposite directions

Based on these results, this σ^A promoter, P₁, is a primary promoter for transcription of ORF 5, ORF 4, ORF 3, β -riboflavin synthase gene and ORF 2.

6. A second DNA sequence, TTGAAG-(17bp)-TACTAT, resembling a promoter recognized by the σ^A - (vegetative form) of B. subtilis RNA polymerase was identified within the 3' end of ORF 4, approximately 295 bp upstream from ORF 3 and oriented in the same transcriptional direction as ORF 3 (Figure 4). Integration into B. subtilis by a Campbell-type recombination event of an E. coli plasmid containing this promoter sequence on a 0.7 kb Sall-BglII restriction fragment did not cause inactivation of riboflavin production in B. subtilis, results which indicated that this second sequence (P₂) has promoter activity and thus may actually control transcription (in addition to the σ^A P₁ promoter) of ORF 3, the β subunit riboflavin synthase gene and ORF 2. LacZ fusions and Northern analysis confirmed the existence of this promoter.

7. A third DNA sequence, TTGAAT-(18bp)-TAAAAA, possibly resembling the promoter recognized by the σ^A (vegetative form) of B. subtilis RNA polymerase was identified within the intercistronic region between the β subunit of the riboflavin synthase gene and ORF 2, approximately 83 bp upstream of ORF 2 and oriented in the same transcriptional direction (Figure 4). This σ^A promoter, P₃, may also control transcription of ORF 2, in addition to P₁ and P₂.

8. In vitro-coupled transcription/translation analysis of S-30 reactions of the cloned DNA confirmed that ORF 2, ORF 3, ORF 4, and ORF 5 all actually encoded proteins of the size predicted from their respective sequences.

9. Three of the five presumed enzymatic steps in riboflavin biosynthesis were assigned to specific coding regions by comparing predicted amino acid sequences or molecular weights of their products to published protein sequences, using GenBank®, or known protein sizes.

a. The putative protein encoded by the open reading frame between ORF 2 and ORF 3 almost identically matched the published 154 amino acid sequence of the β subunit for the riboflavin synthase enzyme (Ludwig et al., J. Biol. Chem. 262 :1016, 1987). Only one amino acid difference was detected: lysine was substituted for glycine at residue 65. This enzyme is reported to catalyze the formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine from 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H, 3H)-pyrimidinedione-5'-phosphate (Figure 1, structures 5 and 4, respectively) and 3, 4-dihydroxybutanone-4-phosphate.

b. A 39% identity in an 88-amino acid overlap was identified between the putative product of ORF5 and deoxycytidylate deaminase, a 188 amino acid protein encoded by the E. coli bacteriophage T₂ - (Maley et al., J. Biol. Chem. 258 :8290, 1983). Based on this result, ORF 5 most likely encodes the rib-specific deaminase that catalyzes the formation of 5-amino-6-(ribosylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione-5'-phosphate from 2,5-diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinone-5-phosphate (Figure 1, structures 3 and 2, respectively).

c. The predicted molecular weight of the ORF 4 gene product (26,000 Da) was in good agreement with the molecular weight of the α -subunit for riboflavin synthase (23,000 Da; Bacher et al., J. Biol. Chem. 255 :632, 1980). Based on this result, ORF 4 encodes the α -subunit for riboflavin synthase, which catalyzes the final step of the biosynthetic pathway: dismutation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin (Figure 1, structures 5 and 6, respectively) and 5-amino-6-ribitylamino-2,4-(1H, 3H)-pyrimidinedione.

10. The remaining enzymatic steps in riboflavin synthesis were tentatively assigned to coding regions by aligning the position of ORFs to a physical map of rib mutations in the operon (Morozov et al., Mol. Genet. Mik. Virusol. no. 7:42 (1984)). Mutations for defective GTP cyclohydrolase were reported to map to the 0.5 kb HindIII fragment. Since ORF 3 encompasses this restriction fragment, we concluded that ORF 3, at least in part, encodes this enzymatic function, which catalyzes the formation of 2,5-diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinone-5'-phosphate from GTP (Figure 1, structures 2 and 1, respectively). In addition, the biosynthetic gene encoding a rib-specific reductase was reported to be contained entirely within the approximately 1.8 kb HindIII fragment. Since this fragment contains only two complete coding regions, the β subunit of the riboflavin synthase gene and ORF 2, we speculate that ORF 2 encodes the reductase, which catalyzes the formation of 5-amino-6-(ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione-5'-phosphate from 5-amino-6-(ribosylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione-5'-phosphate (Figure 1, structures 4 and 3, respectively).

In addition, a similar rho-independent transcription termination site was detected in the apparent leader region of the operon, downstream of the putative σ^A P₁ promoter but just upstream of the first coding region of the operon, ORF 5 (Figures 4 and 9). This potential terminator structure may be involved in regulation of the rib operon by a termination/ anti-termination mechanism. In addition, a roseoflavin-resistant (R_oF^R) dependent regulatory region is present on a 0.7 kb SalI-BglII restriction fragment of ORF3.

Assignment of rib ORFs to Protein Products

One method for confirming whether the rib-specific ORFs encode proteins is to "visualize" the size and number of proteins synthesized from the cloned DNA in an S-30 in vitro coupled transcription/translation reaction using PRF2 and its various derivatives as templates. The S-30 fraction kit (New England Nuclear; used according to manufacturer's specifications) is especially efficient in translating B. subtilis genes due to the presence of their strong ribosome binding sites.

Using the cloned 10 kb EcoRI fragment of pRF2 or pRF4 as templates, we expected to detect five putative rib-specific proteins: β riboflavin synthase, 14.7 kilodaltons (kd) (Ludwig et al., J. Biol. Chem. 262 :1016, 1987); and the proteins from ORF 2, 13.6 kd; ORF 3, 43.7 kd; ORF 4, 23 kd; and ORF 5, 39.7 kd. We also expected to detect at least two other proteins, encoded by ORF 6 (11.6 kd) and ORF 1 (at least 18.7 kd), as well as any additional proteins encoded by genes present in the unsequenced regions of the 10 kb cloned DNA fragment. In addition, vector-associated proteins, including the bla and cat antibiotic resistance gene products, were also expected (the tet gene is not strongly expressed in S-30 reactions).

Excluding the bla- and cat-specific proteins (32 kd and 18 kd, respectively) and other vector-associated proteins, a total of six major ³⁵S-labelled proteins were detected, with molecular weights of 47 kd, 44 kd, 38 kd, 26 kd, 20 kd and 15 kd, on a 15%-SDS polyacrylamide gel of the S-30 reactions with pRF2 or pRF4. To assign these protein products to their corresponding rib-specific ORFs, S-30 reactions were repeated using various available deletion derivatives, cat-insertion derivatives, and subcloned fragments of the 10 kb EcoRI cloned DNA (Figure 10). The results are shown in Table V.

TABLE V

| RIB-SPECIFIC PROTEINS OBSERVED IN S-30 REACTIONS | | | | |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Plasmid | 47,000 Daltons (ORF 3) | 44,000 Daltons (ORF 5) | 26,000 Daltons (ORF 4) | 15,000 Daltons (ORF 2) |
| pRF2 | + | + | + | + |
| pRF4 | + | + | + | + |
| pRF21 | - | - | + | - |
| pRF5 | - | - | - | + |
| pRF29 | - | - | - | - |
| pRF12 | + | - | + | + |
| pRF10 | - | - | - | - |
| pRF38 | - | - | - | - |
| pRF24/pRF20 | - | + | + | + |
| pRF23 | + | - | + | + |

Based on these results, protein products were assigned to ORF 3 (47 kd); ORF 5 (44 kd); ORF 4 (26 kd); and ORF 2 (15 kd), with molecular weights in close agreement with the predicted sizes.

The assignment of products to ORF 2 and the β riboflavin synthase gene were less straightforward than the assignments to the other ORFs. Since the S-30 reaction of pRF2 produced a 15 kd protein which was close to the predicted size of the proteins encoded by either gene, it was first assumed that this protein band actually contained both protein species. However, the cat insertion into ORF 2 in plasmid pRF38 completely removed this protein band, replacing it with a much smaller protein of 6 kd, which is in close agreement with the predicted size of the truncated ORF 2. Based on these results, the 15. kd protein appears to be generated only by ORF 2. It is not clear why the β riboflavin synthase protein is not visualized on the gels of the S-30 reactions. Taken in total, however, the results confirmed the existence of five rib -specific coding regions: ORF 5, ORF 4, ORF 3, ORF 2 and the β riboflavin synthase gene.

In addition, ORF 1 appeared to encode a 38 kd protein, while no product was identified for ORF 6.

Regulatory Mechanisms of the rib Operon

In *B. subtilis*, a recurring pattern of gene organization and regulation for biosynthetic pathways has been observed by several investigators. The nucleotide sequences of the tryptophan biosynthetic pathway (Henner et al., *Gene* 34 :169, 1984) and the de novo purine nucleotide pathway (Ebbole and Zalkin, *J. Biol. Chem.* 262 :8274, 1987) of *B. subtilis* both contain clustered, overlapping genes transcribed as a polycistronic message and regulated at least in part by a novel transcription termination/anti-termination mechanism, involving a repressor protein which can be encoded by a gene unlinked to the biosynthetic operon (Zalkin and Ebbole, *J. Biol. Chem.* 263 :1595, 1988). Since we found that the organization of the rib biosynthetic and regulatory genes is strikingly similar to those of the *B. subtilis* trp and pur pathways, we hypothesized that the rib operon might be regulated, at least in part, in a similar manner.

Briefly, the key characteristics of the transcription termination/anti-termination model include (Shimotsu et al., *J. Bacteriol.* 166 :461, 1986): (i) the presence of a long 5' leader sequence that precedes the first gene in the operon; (ii) the presence in the RNA leader of two or more overlapping dyad symmetries that have the potential to form mutually exclusive RNA stem-loops, one structure functioning as a rho-independent transcription terminator and the other as an "anti-terminator" (blocking the formation of the rho-independent transcription terminator); (iii) under repressive conditions, the repressor protein, activated by the end product of the pathway, binds to the nascent mRNA at a site which prevents formation of the anti-terminator, thus allowing formation of the terminator which terminates transcription; (iv) under derepressive conditions, binding of the unactivated repressor is precluded, resulting in the formation of the anti-terminator causing read-through transcription into the coding region of the operon.

As discussed above, the most likely site for initiation of transcription in the rib operon is a σ^A promoter, P₁, located about 290 bp upstream from the first gene in the operon. Preliminary analysis of the RNA leader sequence indicated that it contained most, if not all, of the structures required for regulation by the

termination/anti-termination model. Within this region, a stem-loop structure followed by a string of thymidines resembling a rho-independent transcription terminator was identified approximately 50 bp upstream of ORF 5; this sequence has the potential to form a hairpin with a ΔG of -26 kcal/mol (Figure 9). In addition, several potential stem-loop structures with ΔG 's ranging from -13 to -16 kcal/mol were located within the rib 5' leader that could possibly qualify as the anti-terminator sequence.

In addition to the primary site for the initiation of transcription, usually located upstream from the first gene in the operon, there exist in some biosynthetic pathways secondary promoter sites located within the internal regions of the operon. The possibility of there being a second promoter site within the rib locus was also suggested by previous R-loop heteroduplex studies of the rib operon (Osina et al., FEBS Letters 196 :75-78, 1986), showing two or more sites for the initiation of mRNA synthesis. Our preliminary analysis of the intercistronic gaps of the rib operon did not detect such secondary promoter sites. However, when this analysis was extended to all of the sequences within the operon, another σ^A promoter, P_2 , was identified within the 3' end of ORF 4, just downstream from the Sall restriction site (Figure 4). Thus it is possible that the expression of ORF 2, ORF 3, and the β -subunit for riboflavin synthase is also under the control of this secondary promoter. In addition, a possible third σ^A promoter, P_3 , was identified just upstream of ORF 2. Therefore ORF 2 is possibly also under the control of this additional promoter.

The location of putative coding regions, promoters and transcription termination sites on the DNA sequence of the 5.5 kb *B. subtilis* rib-specific region is shown in Table VI.

TABLE VI

| CODING REGIONS, PROMOTER, AND TRANSCRIPTION TERMINATION SITES OF THE <i>B. SUBTILIS</i> RIB OPERON | | |
|---|---------------------------------|------------------------|
| | | bp Number ^a |
| Coding Regions | ORF 6 | 364-678 |
| | ORF 5 | 1101-2183 |
| | ORF 4 | 2197-2841 |
| | ORF 3 | 2859-4052 |
| | β riboflavinsynthase gene | 4088-4549 |
| | ORF 2 | 4665-5036 |
| | ORF 1 | 5567-5057 ^b |
| σ^A Promoters | P_1 | 771-799 |
| | P_2 | 2528-2556 |
| | P_3 | 4545-4574 |
| rho -Independent Termination Sites | Upstream from 5' promoter | 708-748 |
| | Within 5' leader RNA | 1034-1067 |
| | At 3' end of rib operon | 5038-5090 |

^a of Figure 3.

^b Coding region oriented in opposite direction.

Example 8: Construction of vectors containing a modified rib operon

The above functional analysis of the rib operon of *Bacillus subtilis* for the first time delimiting the regulatory regions and open reading frames in the nucleotide sequence permits construction of new vectors which are useful for increasing the yield of riboflavin production. The knowledge of the location of the specific genes required for riboflavin biosynthesis, of the location of transcriptional control regions, and other relevant regions (e.g., RBS) in those genes allows changes in such regions to be made. There follow a few examples of such manipulations.

Construction of an integration plasmid with a rib operon on a smaller DNA fragment

The integrating vector used to construct the riboflavin overproducing strain RB50::[pRF8] contains a 10 kb EcoRI fragment including the rib operon. Since the rib operon appears to occupy less than 6 kb of DNA a new integration vector was constructed (pRF40) containing the rib operon on a smaller DNA fragment. The smaller size of this clone allows higher amplification of rib genes resulting in higher yields of riboflavin.

Referring to Fig. 12, pRF40 was constructed from pRF36 which is a plasmid in which the 0.8 kb NcoI fragment of pRF2 is replaced with a cat gene. The rib operon is contained on a 6.5 kb XbaI-EcoRI fragment. This fragment was isolated and ligated to pUC19 (Yanisch-Perron et al., Gene 33, 103, 1985; available from New England Biolabs, Boston, MA, USA and Bethesda Research Laboratories, Maryland, USA) digested with XbaI and EcoRI. The ligated DNA was transformed into DH5 α E. coli and plated onto LB plates containing 40 μ g/ml X-gal and 50 μ g/ml ampicillin. Analysis of miniprep DNA prepared from white colonies indicated that pRF39 contained the 6.5 kb XbaI-EcoRI fragment.

pRF39 was digested with EcoRI, treated with CIAP, and then ligated to a 1.6 kb EcoRI fragment containing the cat gene. The ligated DNA was then transformed into DH5 α E. coli and appropriate colonies selected for plating onto LB + 10 μ g/ml chloramphenicol; two colonies were chloramphenicol-resistant. Analysis of miniprep DNA prepared from these colonies confirmed the presence of the cat gene. One of these plasmids is pRF40 (Fig. 14).

Construction of plasmids containing transcriptionally modified rib operon

As described above, it is useful to replace the promoter and operator regions of the riboflavin operon with promoters allowing constitutive expression of the riboflavin biosynthetic genes. Plasmids containing such constructs can then be used to produce bacterial strains which will produce increased levels of riboflavin. A few examples, not limiting in the invention, are provided below.

Referring to Fig. 13, the riboflavin promoter and regulatory region were removed and replaced with an SPO1 promoter. We took advantage of the BglII site located at position 1130 at the start of ORF3. Oligonucleotides were synthesized (RB5 and RB6, see Fig. 18) that recreated the DNA sequence 5' to the BglII site (the first few amino acids of ORF5 and the SD sequence) up to position 1058. Reconstruction of the 5'-end of the operon stopped before any of the proposed DNA regulatory structures (Fig. 13). At their 5' ends the oligonucleotides contained BamHI, NsiI, and EcoRI restriction sites, allowing for placement of various promoters 5' to the rib operon. Because of the various restriction sites in the rib operon it was necessary to construct the operon with the new promoters in several steps, as follows.

A 1.4 kb Sall-BglII fragment was isolated from pRF36 (Fig. 13). This fragment was ligated with the two oligonucleotides and EcoRI-Sall-digested pUC19. The ligated mixture was then transformed into E. coli DH5 α cells and plated onto LB containing 50 μ g/ml ampicillin and 40 μ g/ml X-gal. Minipreps were prepared from Ap^r white colonies; one plasmid having the desired structure is pRF46 (Fig. 13).

pRF46 was digested with BamHI and Sall and the 1.4 kb fragment isolated. This fragment was then ligated with the 400 bp EcoRI-BamHI fragment of pNH202 (pUC8 containing the SPO1-15 promoter, Lee and Pero, J. Mol. Biol., 152:247-265, 1981) and pUC19 cut with Sall and EcoRI. The ligated DNA was then transformed in DH5 α E. coli, which were plated onto LB + ampicillin + X-gal. Miniprep DNA was prepared from white colonies; and pPRF48 had the desired structure (Fig. 13).

pRF48 was digested with EcoRI and Sall and the 1.8 kb fragment isolated. This fragment was ligated with the 4.0 kb XbaI-Sall fragment (containing the rest of the rib operon) from pRF2 and XbaI, EcoRI-cut pUC19. The ligated mixture was then transformed into E. coli DH5 α cells which were plated on LB + ampicillin + X-gal. Miniprep DNA was prepared from white colonies; pRF49 had the desired structure, and supernatants from culture containing this plasmid was yellow, indicating riboflavin production (Fig. 13).

To place the cat gene in pRF49, to allow selection in B. subtilis, the plasmid was digested with XbaI and ligated to a 1.3 kb cat-containing XbaI fragment from pEcc4. The ligated DNA was transformed in E. coli DH5 cells. Hundreds of Ap^r colonies resulted, and the colonies were patched onto plates containing LB + 10 μ g/ml chloramphenicol. Approximately 10% of the colonies grew on the chloramphenicol plates, indicating the presence of the cat gene. One cat-containing plasmid is called pRF50 (Fig. 14).

The above example shows placement of a new promoter upstream of ORFs. We found that it is also useful to place a promoter after P₂ between ORF3 and ORF4 in order to further increase riboflavin production. An example of such construction now follows.

Referring to Figs. 14 and 15, to place a copy of the SPO1-15 promoter upstream of ORF3 we made use of the restriction sites adjacent to the ORF4-ORF3 junction. The ClaI site at position 2767 is located at the end of ORF4 and is unique in the rib operon. Another useful restriction site near the beginning of ORF3 is the DraI site at position 2892. Oligonucleotides were synthesized that recreated the sequence from the

above-mentioned *Dra*I site past the start of ORF3 and placed a unique *Bam*HI site before the beginning of ORF3 (linkers P2-A and P2-B, Fig. 18). Another set of oligonucleotides recreated the sequence from the *Cla*I site past the end of ORF4 and placed an *Eco*RI site at that location (linkers P2-CII and P2-DII, Fig. 18). The SPO1-15 promoter, located on a *Eco*RI-*Bam*HI fragment, was then placed between the *Bam*HI and *Eco*RI sites created by the oligonucleotides. The entire operon was put together with this additional SPO1-15 promoter as follows.

Referring to Fig. 15, the 750 bp *Sal*I-*Bgl*III fragment containing the ORF4-ORF3 function was subcloned to pIC2OR (Marsh et al., Gene 32, 481-485, 1984). The resulting plasmid, pRF57, was then digested with *Dra*I and *Bgl*III, and the predicted 270 bp *Dra*I-*Bgl*III fragment was isolated. This fragment and linkers P2-A and P2-B were ligated to pIC2OR cut with *Sal*I and *Bgl*III. The linkers placed *Bam*HI and *Sal*I sites upstream of the 5' end of ORF3. (The *Sal*I site was chosen for convenience since *Bgl*III and *Bam*HI sites are compatible and will be removed later.) The ligation was transformed into *E. coli* DH5 α cells. Plating onto LB medium + Amp and X-gal resulted in white colonies; pRF58 had the desired structure. The 330 bp *Bgl*III-*Sal*I fragment from pRF58 was isolated and ligated with 3.3 kb *Bgl*III-*Xba*I fragment containing the 3'-end of the rib operon from pRF36 (Fig. 12) and pUC19 cut with *Xba*I and *Sal*I. The ligated DNA was then transformed into *E. coli* DH5 α cells, resulting in white colonies; pRF62 (Fig. 15) had the desired structure. For convenience, the 3.6 kb *Bam*HI-*Xba*I fragment was isolated from pRF62 and subcloned into *Bam*HI-, *Xba*I-cut pUC19 (pRF64, Fig. 15). This plasmid now contained the 3.6 kb 3'-end of the rib operon with an engineered *Bam*HI site preceding ORF3.

To place the SPO1-15 promoter in front of the 3'-half of the rib operon containing the last three open reading frames, we digested pRF64 with *Eco*RI and *Bam*HI and ligated it to a 400 bp *Eco*RI-*Bam*HI fragment containing the SPO1-15 promoter. The ligated DNA was transformed into *E. coli* DH5 cells and miniprep DNA was prepared; pRF65 has the desired structure.

The SPO1-15 promoter was then engineered to place a *Cla*I site upstream of the promoter to reconstruct the end of ORF4. The *Eco*RI-*Bam*HI fragment from pNH202 containing the SPO1-15 promoter was ligated with linkers P2-CII and P2-DII and pIC2OR-digested with *Bam*HI and *Cla*I. The ligated DNA was then transformed into *E. coli* DH5 α cells. White colonies resulted and miniprep analyses indicated that pRF63 had the desired structure. The 470 bp *Cla*I-*Bam*HI fragment was isolated then from pRF63 and ligated to the 2kb *Eco*RI-*Cla*I fragment from pRF49 containing the SPO1-15 promoter and the 5'-end of the rib operon and pRF64 (Fig. 15), containing the SPO1 promoter and the 3'-end of the operon, digested with *Eco*RI and *Bam*HI. The ligated DNA was then transformed into *E. coli* DH5 α cells. Miniprep DNA was prepared; pRF66 had the desired structure. In addition, *E. coli* containing pRF66 produced small amounts of riboflavin on LB medium + ampicillin plates, confirming that the operon was still intact.

The last step was to ligate the *cat* gene into the unique *Xba*I sites of pRF66 as described above. The resulting plasmid, pRF69 (Fig. 15) contained the *cat* gene in the same direction as the rib operon.

To construct a plasmid containing the entire operon with the natural or wild-type ribP₁ promoter and the SPO1-15 promoter after ribP₂, the 6.3 kb *Eco*RI-*Bam*HI fragment of pRF64, the 2.75 kb *Eco*RI-*Cla*I fragment of pRF36, and the 470 bp *Cla*I-*Bam*HI fragment of pRF63 were ligated and transformed into *E. coli* DH5 α cells. About 50% of the Ap^r colonies were yellow, indicating riboflavin production. Miniprep DNA was prepared from yellow colonies and pRF68 had the desired structure (Fig. 16). A *cat* gene was added to pRF68 at the *Xba*I site, as discussed above, to generate pRF71 (Fig. 16). This plasmid contained the *cat* gene in the same direction as the rib operon.

As another example of the construction of useful plasmids in this invention, there now follows an example in which one or more promoters can be introduced within the riboflavin operon without prior removal of existing DNA sequences.

As an example, a prototype modified operon was constructed in pRF78, which contains a single copy of the SPO1-15 promoter inserted within a 30 bp non-essential region located between ribP₁ and a putative rho-independent transcriptional termination site (Fig. 14), an inactivated ribP₁ promoter to prevent possible transcriptional interference of the SPO1-15 promoter, an active ribP₂ promoter, the five structural genes encoding rib biosynthetic enzymes, and approximately 1.5 kb of flanking DNA nucleotide sequences downstream from the end of the riboflavin operon.

Referring to Fig. 14, the 1.7 kb *Nco*I-*Pst*I fragment of pRF2, a fragment that contains the 5' promoter region of the rib operon and flanking regions, was first subcloned into mp19, a derivative of the *E. coli* bacteriophage vector M13 (United States Biochemical Catalog, 60-61, 1987; available from New England Biolabs, Massachusetts, USA). One recombinant phage, M1.7, was recovered and standard DNA sequence analysis of the promoter region revealed a spontaneous mutation of the -10 region of the ribP₁ promoter, a TA-to-CT change, which may inactivate the promoter. Single stranded DNA was prepared and annealed to a synthetically-generated 55 bp DNA oligomer (see Fig. 17), containing a combination of restriction enzymes

sites, 5'-EcoRI-SmaI-BamHI-3', flanked on either side by additional sequences homologous to the DNA region upstream from ribP₁. Double-stranded DNA molecules were synthesized using standard site-directed mutagenesis (SDM) protocols. These DNA molecules were introduced into the E. coli host TG-1 (Amersham Corp., Illinois, USA) by transfection to generate recombinant phage plaques. One recombinant phage was found to contain the desired modified DNA sequence, as determined by standard DNA sequence analysis.

The modified rib promoter region was then rejoined to the rib structural genes of the operon using a pair of unique NsiI restriction enzymes sites 750 bp apart of the flank the ribP₁ region and surrounding sequences. Double-stranded DNA molecules of the phage recombinant were prepared, digested with NsiI, the 750 bp fragment isolated, and the fragment ligated to dephosphorylated, 8.7 kb NsiI fragment of pRF39ΔR1 (a plasmid derived from pRF39, Fig. 12, that contains the wild-type rib operon). The ligated DNA molecules were introduced into E. coli DH5α cells by transformation, selecting for ampicillin-resistance, which resulted in the recovery of an Ap^r colony harboring the desired recombinant plasmid, pRF75.

The SPO1-15 promoter was next inserted upstream from ribP₁ by digesting pRF75 with a combination of EcoRI and BamHI enzymes, ligating the cut DNA to purified 400 bp EcoRI-BamHI SPO1-15-containing restriction fragment, and introducing the ligated DNA into E. coli DH5α cells by transformation, selecting for ampicillin-resistance. One Ap^r colony was found to harbor the recombinant plasmid, pRF77, containing the desired SPO1-15-modified rib operon. A chloramphenicol-resistance gene, cat, on a 1.6 kb XbaI restriction fragment, was subsequently introduced into pRF77 at the unique XbaI site, generating plasmid pRF78 (Fig. 14).

This prototype operon was further modified to contain an active ribP₁ promoter, and/or a second copy of the SPO1-15 promoter introduced downstream from ribP₂ within a intercistronic region between the rib coding regions ORF3 and ORF4, as described above. For example, plasmid pRF88, containing a derivative of the modified rib operon in pRF78 with an active ribP₁ promoter (Fig. 14) was constructed by the same procedure described above, using a recombinant phage containing the wild-type ribP₁ promoter. In other examples, a second copy of the SPO1-15 promoter, located downstream from ribP₂, was inserted into the existing modified rib operon-containing plasmids pRF78 and pRF88 by removing the 2.0 kb BglII fragment of either plasmid DNA and inserting the 2.4 kb BglII fragment of pRF66, generating plasmids pRF81 and pRF89 respectively (Fig. 14).

Construction of Ade⁺ RB50 strains

It is important to use strains of bacteria that require as few components to be added to a fermentation medium as possible. Such strains are cheaper to ferment in order to produce riboflavin. To this end, adenine revertants which contained amplified modified rib operons were constructed. These revertants may not be true revertants of pur-60, but rather include mutations at another site which suppresses the requirement for adenine. As discussed below they produce about 25% more riboflavin than the non-reverted strains. Examples of such constructions are now described.

Plasmids pRF8, pRF40, pRF50, pRF69, pRF71, pRF78, pRF81, pRF88 and pRF89 were each transformed into RB50 (a RoF^r, deregulated B. subtilis strain) selecting for chloramphenicol resistance (Cm^r). A resistant colony was chosen for each strain. Ade⁺ revertants of each strain was isolated by growing bacteria in RMM1 broth containing 10 μg/ml adenosine, and plating samples of the cultures onto minimal agar plates. One colony from each Ade⁺ strain was selected and the vector DNA was amplified by selecting colonies that grow on increasingly higher levels of chloramphenicol, to a maximum level of 60 μg/ml.

Second site Integration

As described above, it is important to amplify an engineered rib operon in the B. subtilis chromosome to achieve high titers of riboflavin. It is also important to ensure that the number of DNA copies of the rib operon within a chromosome are not limiting to riboflavin production. Further amplification of the rib operon can be achieved by integrating and amplifying copies of the rib operon at more than one site in the B. subtilis chromosome to further increase riboflavin yield. One example of how such second site integration can be achieved is described below.

The above described vectors have all relied upon the cat gene to allow integration at the site of the rib operon. In order to insert the rib genes at a second site, it is preferable to have a different antibiotic resistance gene for use at that second site. For example, a tetracycline-resistance (tet) from B. subtilis can be used (Perkins and Youngman, J. Bacteriol., 155 :607-615, 1983). Such tet genes are well known to those

of ordinary skill in the art and are readily available to such persons. In one such construction, for example, pRF78 (Fig. 14), which contains a modified version of the rib operon, the plasmid can be cut with XbaI and ligated to a 2.4 XbaI fragment containing the tet gene. The resulting plasmid contains the tet gene at the XbaI site and is called pRF85.

5 A strain which is deleted for the entire rib operon and which has a tet gene integrated at a second site is required to cause integration of pRF85 at that site. One such site is the bpr gene encoding bacillopeptidase F, a minor non-essential extracellular protease. An *E. coli* plasmid containing the bpr gene, pKT2, (Sloma et al., J. Bacteriol., 172 :1470-1477, 1990) was digested with EcoRV. This EcoRV site is in the coding region of bpr. The DNA was then ligated to a 2.4 kb EcoRI fragment containing the tet gene that
10 had been blunt-ended. The resulting plasmid (containing the tet gene at the EcoRV site of bpr) was called pKT2-tet. This DNA was linearized with EcoRI and then transformed into RB52, a strain deregulated for riboflavin synthesis. Tet^r colonies resulted and one such colony was called RB54. The integrated tet gene at bpr will function as a homologous sequence for the integration of pRF85.

To ensure that the cloned riboflavin operon of pRF85 would be inserted at the second chromosomal site
15 containing the tetracycline-resistance gene, a region containing the original riboflavin operon and flanking DNA, equalling that contained in pRF85, was deleted from the chromosome of RB54 by in vitro methods. Briefly, this involves first generating an *E. coli* recombinant plasmid where the cloned riboflavin operon and flanking regions between the NcoI and XbaI restriction sites are removed and replaced by a chloramphenicol-resistance gene, cat, that is expressed in *B. subtilis* bacteria. This plasmid is then used to
20 delete the chromosomal riboflavin operon by transforming RB54 with linearized plasmid molecules and selecting for chloramphenicol resistant (Cm^r) bacteria. Cm^r bacteria result from a recombinant event (marker-replacement) which replaces the wild-type rib genes with the deleted copy containing the cat gene.

Specifically, plasmid pRF34 (see example 6) was used to generate an *E. coli* plasmid containing an in vitro-generated riboflavin operon deletion. This plasmid is derived from pRF2 where the riboflavin operon is
25 flanked on either end by two unique XbaI sites (one site located upstream from the 5'-end of the rib operon next to the deleted 0.8 kb NcoI fragment and the second site located approximately 1.6 kb downstream from the end of the operon) and a cat gene is inserted outside of this region. By digesting pRF34 with XbaI and ligating the cut DNA molecules under dilute DNA concentrations, a recombinant plasmid, pRF82, was recovered where a 7.2 kb region containing the riboflavin operon is removed and essentially replaced with
30 the cat gene. Plasmid pRF82 was linearized by restriction enzyme digestion and the cut DNA used to remove the chromosomal riboflavin operon of RB54 by DNA transformation, selecting for Cm^r bacteria, resulting in marker replacement. Cm^r colonies were screened for riboflavin auxotrophy and one Rib⁻Cm^r colony, RB55, was recovered for further investigation.

Plasmid pRF85 was transformed into strain RB55, selecting for Rib⁺. One Rib⁺ transformant was
35 chosen and called RB58. This strain has the rib operon integrated at bpr by homologous recombination between the tet^r genes in the plasmid and the chromosome. Chromosomal DNA from RB58 was prepared and can be used to transform RB50::[pRF69], selecting for Tet^r. These resistant colonies will then have the modified rib operon integrated at the site of the rib operon and at bpr. The rib operon integrated at rib will be amplified by selecting for colonies that grow in the presence of increasing levels of chloramphenicol as
40 described above, and the second copy of the rib operon will be amplified by selecting colonies that grow on increasing levels of tetracycline.

Example 9: Fermentative Production of Riboflavin

45 Evaluation of riboflavin-overproducing strains was conducted in Chemap 14-liter vessels in carbon-limited fed-batch fermentations, with riboflavin content measured by HPLC. Since enzymes encoded by the genes for riboflavin synthesis are rate-limiting, the rib genes, which were amplified, were maintained at high-copy number by the inclusion of 60 µg/ml chloramphenicol in the inoculum seed train, but not in the fermentor.
50

A culture of *B. subtilis* RB50::[pRF69] was grown on Tryptose Blood Agar Base (TBAB Difco) containing 60 µg/ml of chloramphenicol (CAM). Colonies were transferred to 300 ml baffled flasks containing 25 ml of riboflavin minimal medium (RMM; containing sodium glutamate 2.0 g/l, Casamino acids (Difco) 0.2 g/l, Yeast extract (Difco) 0.2 g/l, KH₂PO₄ 6.0 g/l, K₂HPO₄ 14.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/l, sodium citrate 1.0 g/l,
55 MgSO₄•7H₂O 0.2 g/l, adenosine 0.05 g/l, glucose 15.0 g/l, pH 7.0) with 60 µg/ml CAM. The inoculated flasks were incubated by shaking at 250 rpm and 37 °C. After 8 hours, sterile glycerol was added to a final concentration of 15% and 1 ml aliquots were stored at -80 °C.

In order to initiate a fermentation a frozen vial of RB50::[pRF69] was thawed at 37 °C and transferred

into a 300 ml baffled flask with 25 ml of RMM with 60 μ g/ml CAM and shaken at 250 rpm and 37 °C. After 8 hours, 6 ml of the growing culture was used to inoculate 300 ml of fermentation medium (see Table VII below) in a 2 liter transfer flask. Such flask contained 300 ml of fermentation medium to which had been added 90 ml of a mixture of 15% glucose and 30% maltose. Chloramphenicol was added to a final concentration of 60 μ g/ml. After incubation for 12 hours at 200 rpm on a shaker with a 2" diameter orbit at 37 °C, the contents of such a flask was transferred to 7 liters of fermentation medium in a 14 liter fermentation vessel.

During fermentation, the broth was continually monitored for pH and dissolved oxygen (DO₂). Off gas was continuously analyzed by quadrupole mass spectrometry and carbon dioxide evolution (CER) and oxygen uptake rates were recorded.

A comparison of several fermentations demonstrated the reproducibility of the control systems. The initial carbohydrate was exhausted from fermentation with RB50::[pRF8]₆₀ after 4 hours of growth, causing a rise in pH and a fall in CER. At that point, carbohydrate feeding was initiated and logarithmic growth resumed until DO₂ became limiting at 6 hours. The rate of carbohydrate feeding was computer-controlled to maintain the DO₂ between 10-20% of saturation throughout the remaining fermentation time.

Excess carbohydrate in the fermentors does lead to oxygen starvation and reduced riboflavin production. Oxygen transfer limitations determine the duration of logarithmic growth, final cell density and the riboflavin production rate. To increase the oxygen transfer rate, Chemap fermentors were run at 1000 rpm with a head pressure of 0.6 atmospheres.

Supplementation of the medium carbohydrate feed with yeast extract led to an increase in riboflavin production as compared to media without supplementation (Figure 11, open squares: RBF-14; Table VII). However, because of its high cost, the amount of yeast extract was systematically reduced by substituting less expensive, inorganic ingredients. Substitution of ammonium hydroxide for sodium hydroxide in pH control allowed a reduction of yeast extract in the feed and resulted in an increase in both cell mass and riboflavin titer (Figure 11, closed squares: RBF-22; Table VII). Fermentation times were also reduced. In other fermentations, moreover, yeast extract was completely eliminated from the feed and replaced with a combination of inorganic salts of ammonium and phosphate, resulting in a further increase in riboflavin production and a reduction of process time (Figure 11, open circles: RBF-23; Table VII).

The original RB50::[pRF8]₆₀ was auxotrophic for adenine because of its pur-60 mutation. When experiments were conducted to determine the minimum amount of adenosine required by the strain, in order to minimize its inhibition of earlier biosynthetic enzymes involved in the pathway leading to the riboflavin-precursor IMP (Figure 2), RB50::[pRF8]₆₀ (and, in general, RB50 strains with a rib operon amplified within their chromosome) was found to be unstable in its adenosine requirement and prototrophic revertants (Ade⁺) were produced at a fairly high frequency. In shake flasks, the Ade⁺ revertants appeared to grow and produce riboflavin at least as well as the RB50::[pRF8]₆₀ parent. When evaluated in fermentors, the revertant, RB50::[pRF8]₆₀(Ade⁺), did not require adenosine in the media formulation. More importantly, the revertant grew at a faster rate and produced 25% more riboflavin than its parent strain in less time. A titer of 5.4 g/l riboflavin was produced in 49 hours (Figure 11, closed circles: RBF-29; Table VII). In additional fermentations, moreover, Hy Soy T was removed from the initial charge or medium and replaced with corn steep liquor resulting in a further increase in riboflavin production to 6.3 g/l in 48 hours. (RBF-42, Table VII).

Under these fermentation conditions, further significant increases in riboflavin production were demonstrated using bacterial strains that contained engineered riboflavin operon DNA. Strains containing the wild-type riboflavin operon on a 6.5 kb EcoRI-XbaI restriction fragment, RB50::[pRF40]₆₀(Ade⁺), produced 7.4 g/l of riboflavin in 48 hours. Moreover, strains containing a transcriptionally-modified rib operon where the ribP₁ promoter and regulatory region were replaced by the constitutive SPO1-15 promoter, RB50::[pRF50]₆₀(Ade⁺), produced 9.0 g/l of riboflavin in 48 hours. These results demonstrate that modification of the riboflavin operon through the removal of regulatory regions and/or through the introduction of stronger, constitutive exogenous promoters leads to increases in riboflavin titer.

TABLE VII

| FERMENTATION COMPONENTS AND CONDITIONS | | | | | |
|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Component | RBF-14 | RBF-22 | RBF-23 | RBF-29 | RBF-42 |
| Initial Charge (g/l) | | | | | |
| Glucose | 10.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 |
| Corn steep liquor | -- | -- | -- | -- | 10.00 |
| Hy Soy T | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 10.00 | -- |
| Sodium glutamate | -- | -- | -- | 5.00 | 5.00 |
| Amberex 500 | 15.00 | 15.00 | 20.00 | 20.00 | 20.00 |
| KH ₂ PO ₄ | 5.00 | 5.00 | 7.50 | 7.50 | 7.50 |
| MgGl ₂ .6H ₂ O | 0.5 | 0.5 | 1.50 | 1.50 | 1.50 |
| MnSO ₄ | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| Adenosine | 0.05 | 0.05 | 0.05 | -- | -- |
| MAZU DF37C | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| FeCl ₃ | -- | -- | 0.025 | 0.02 | 0.02 |
| CaCl ₂ | -- | -- | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| ZnSO ₄ | -- | -- | 0.0005 | -- | -- |
| CuCl ₂ | -- | -- | 0.0013 | -- | -- |
| CoCl ₂ | -- | -- | 0.0013 | -- | -- |
| Nutrient Feed (g/l) | | | | | |
| Amberex 500 | 160.00 | 120.00 | -- | -- | -- |
| NH ₄ Cl | -- | -- | 7.50 | 7.50 | 7.50 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | -- | -- | 7.50 | 7.50 | 7.50 |
| KH ₂ PO ₄ | -- | -- | 15.00 | 15.00 | 15.50 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | -- | -- | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| DL-70 syrup (as DS) | 600.00 | 600.00 | 600.00 | 600.00 | 600.00 |
| pH Control Range | | | | | |
| 6.6 | H ₂ SO ₄ | H ₂ SO ₄ | H ₂ SO ₄ | H ₂ SO ₄ | H ₂ SO ₄ |
| 6.5 | NaOH | NH ₄ OH | NH ₄ OH | NH ₄ OH | NH ₃ |
| Conditions | | | | | |
| Air (vvm) | 1.0 | 1.5 | 1.5-2.0 | 1.5 | 1.50 |
| RPM | 1000.0 | 1000.0 | 1000.0 | 1000.0 | 1000.0 |
| Temp. (°C) | 37.0 | 37.0 | 37.0 | 37.0 | 37.0 |
| Pressure (bar) | 0.5 | 0.5 | 0.5-0.75 | 0.6 | 0.6 |
| Riboflavin (g/l) | 3.4 | 4.1 | 4.3 | 5.4 | 6.3 |
| | (64 hrs) | (56 hrs) | (53 hrs) | (49 hrs) | (48 hrs.) |
| Dry Weight (g/l) | 33.6 | 36.0 | 36.8 | ND | 44.6 |

The kinetics of riboflavin production in the various fermentations were analyzed using the Luedeking-Piret model. In all cases, the specific productivity declined from the conclusion of the exponential growth phase to the end of fermentation. Also, it was clear that riboflavin production was growth-associated under the fermentation conditions used.

We have discovered that the yield of riboflavin can be increased by changing the fermentation components and conditions. The yield of riboflavin can be increased compared to those conditions described above using those fermentation components and conditions shown in Table VIII.

TABLE VIII

| | (g/liter) |
|--|-----------|
| <u>Initial Batch</u> | |
| Yeast Extract | 20 |
| Glucose | 25 |
| KH ₂ PO ₄ | 7.5 |
| MgCl ₂ .H ₂ O | 1.5 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 1.0 |
| MnSO ₄ | 0.05 |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 0.025 |
| Mazu DF37C | 2.5 |
| Corn Steep Liquor | 10 |
| Sodium Glutamate | 5 |
| <u>Feed Medium (3 liters total used)</u> | |
| Glucose | 583.3 |
| NaCitrate | 6.67 |
| KH ₂ PO ₄ | 15 |
| Succinic Acid | 1.67 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.67 |

Briefly, in one such fermentation the starting material is 6.65 liters of batch medium and 0.35 liters of bacterial (RBSO::[pRF50]₆₀Ade⁺) inoculant. Oxygen levels are monitored with a Chemap polarographic dissolved oxygen electrode. Dissolved oxygen levels are maintained at 15% ± 5% by means of computer regulated addition of the feed medium. Total feed added is about 3.0 liters in 48-56 hours. Fermentation pH is maintained at 6.5 ± 0.1 (using 1N H₂SO₄ and NH₃ gas), and fermenter pressure is maintained at 0.6 bars, and air flow at 10.5 liters/min. Under these conditions, strain RB50::[pRF50]₆₀(Ade⁺) produced 11.0 g/l riboflavin in 48 hours, which represents an improvement in production of approximately 20% compared to the previous fermentation conditions. Finally, a further increase in riboflavin production was demonstrated using the bacterial strains RB50::[pRF69]₆₀(Ade⁺) containing a transcriptionally-modified riboflavin operon containing two SPO1-15 promoters, one replacing ribP₁ and regulatory sequences, and a second inserted between ORF3 and ORF4. This strain produced 13.0-14.0 g/l riboflavin in 48 hours, and 15 g/l in 56 hours, demonstrating that increased transcription of the riboflavin operon using two strong exogenous promoters increases production levels of riboflavin.

Deposit of Microorganism

Plasmid pRF69 has been deposited with the American Type Culture Collection on June 6, 1990 under the Budapest Treaty and was assigned Accession No. ATCC 68338.

E. coli strain DH5 containing plasmid pRF50 has been deposited with the American Type Culture collection on May 30, 1990 under the Budapest Treaty and was assigned Accession No. ATCC 68332.

E. coli strain DH5 alpha containing plasmid pRF78 has been deposited with the American Type Culture collection on May 30, 1990 under the Budapest Treaty and was assigned Accession No. ATCC 68333 and Bacillus subtilis strain RB58 has been also deposited with the American Type Culture collection on May 30, 1990 under the Budapest Treaty and was assigned Accession No. ATCC 55053.

Bacillus subtilis strain RB50 was deposited on May 23, 1989 with the Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Peoria, Illinois, under the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedures, and was assigned accession number B 18502.

Claims

1. A vector comprising first a nucleic acid sequence of bacterial or yeast origin coding for one or more riboflavin biosynthetic proteins and second one or more transcription elements not naturally associated with this nucleic acid sequence.
- 5 2. A vector according to claim 1 wherein said nucleic acid sequence of bacterial origin is derived from *Bacillus* especially *Bacillus subtilis* or *E. coli*.
3. A vector according to claim 1 or 2 wherein said nucleic acid sequence is coding for at least 5 riboflavin biosynthetic proteins.
4. A vector according to any one of claims 1 to 3 which comprises one or two such transcription elements.
- 10 5. A vector according to any one of claims 1 to 4 wherein said transcription element is a promotor.
6. A vector according to claim 5 wherein said promotor is a promoter chosen from a promoter naturally associated with a gene from SPO1 bacteriophage, a promoter naturally associated with *veg*, *amy*; and *apr*, and other transcription regulatory elements activated by the *gen* product of *sacQ*.
7. A vector according to claim 6 which is pRF50, pRF69, pRF70, pRF71, pRF78, pRF81 or pRF89.
- 15 8. A recombinant bacterium comprising at least one copy of an exogenously introduced nucleic acid sequence at one or more sites within its chromosome, which sequence encodes one or more riboflavin biosynthetic proteins and is heritable and capable of expression by the bacterium, such that riboflavin biosynthesis by the bacterium is increased relative to a bacterium lacking such nucleic acid sequence.
9. A recombinant bacterium comprising a bacterium which has been transformed by a vector according to
- 20 any one of claims 1-7 whereby at least one copy of said nucleic acid sequence including said transcription elements has been introduced at one or more sites within its chromosome and said nucleic acid sequence including said transcription elements is heritable and capable of expression by the bacterium, such that riboflavin biosynthesis by the bacterium is increased relative to a bacterium lacking such nucleic acid sequence including said transcription elements.
- 25 10. A recombinant bacterium according to claim 9 wherein said nucleic acid sequence including said transcription elements is present in a plurality of copies at such sites.
11. A recombinant bacterium according to claim 9 or 10 wherein said nucleic acid sequence including said transcription elements has been introduced at one or two sites within its chromosome.
12. A recombinant bacterium according to any one of claims 8 to 11 wherein said bacterium is deregulated
- 30 for riboflavin gene expression.
13. A recombinant bacterium according to any one of claims 8 to 12 wherein said bacterium is an *E. coli* or *Bacillus*, especially *Bacillus subtilis* strain.
14. A recombinant bacterium according to claim 13 wherein said *B. subtilis* strain is RB50 or RB58.
15. A process for the production of riboflavin characterized by growing a recombinant bacterium according
- 35 to any one of claims 8 to 14 under suitable growth conditions.
16. A process according to claim 15 wherein such suitable growth conditions are characterized by limiting the availability of a component of the growth medium in such a way that aerobic conditions for the growth of said recombinant bacterium are maintained.
17. A process according to claim 16, wherein said component is chosen from a carbon source, nitrogen
- 40 source or a component required by said recombinant bacterium.
18. A process according to claim 17, wherein said component is glucose, or a carbonic acid.
19. A process according to claim 16, wherein said limiting step comprises limiting introduction of said component in a feed medium.
20. A process according to claim 19, wherein said component is glucose, or a carbonic acid.

45

50

55

Fig. 1

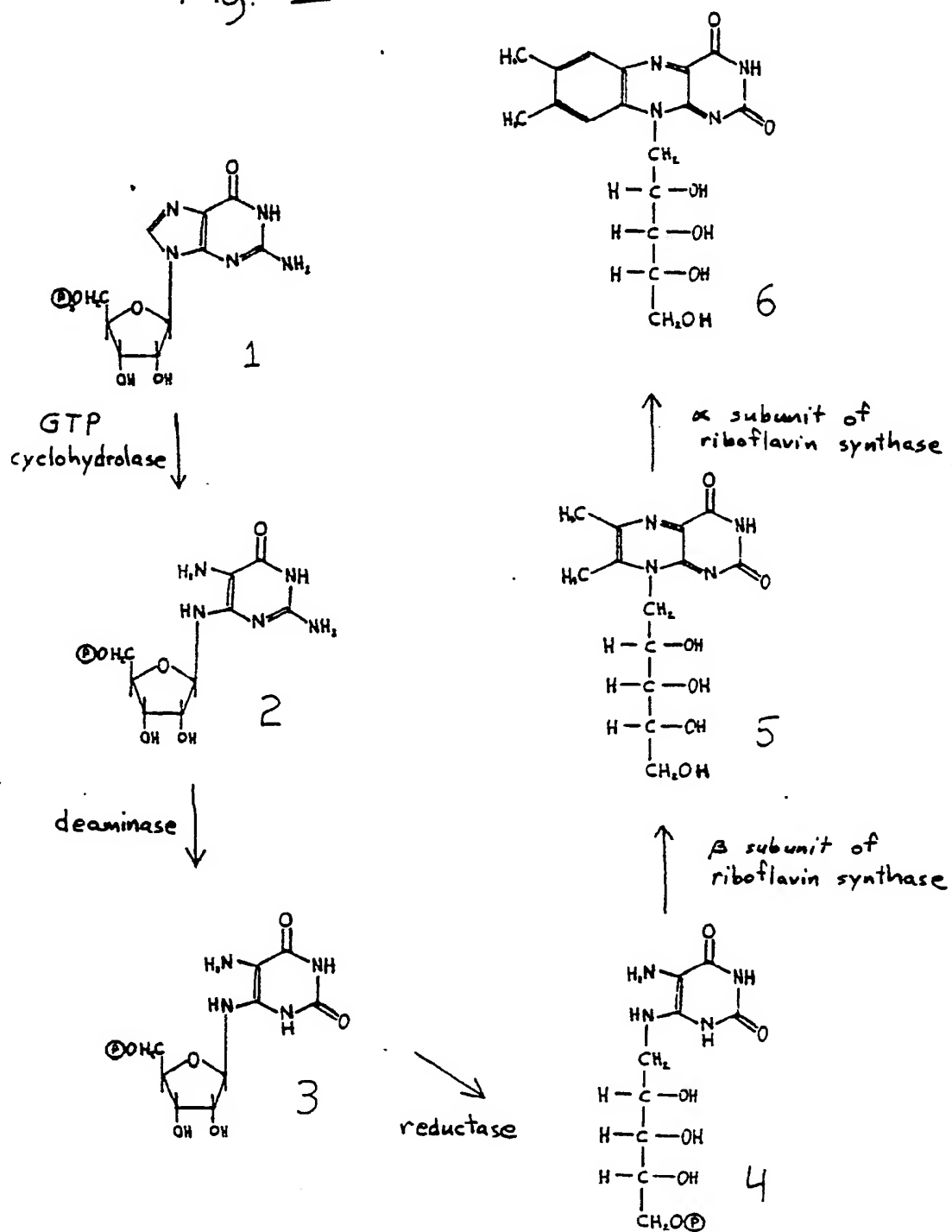


FIGURE 2.

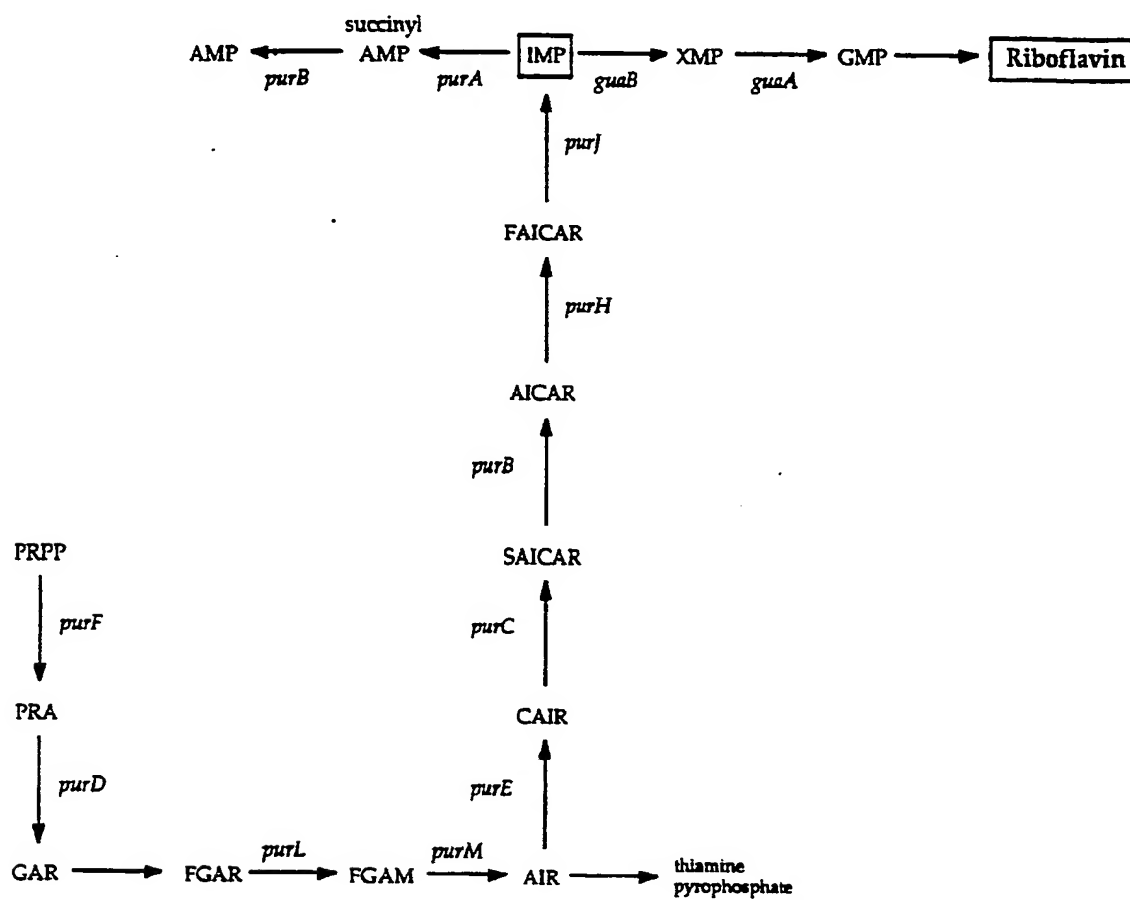


FIGURE 3A

| | | | | |
|-----|---|----|---|-----|
| S N | N | XH | M | S H |
| S L | D | MN | N | P 8 |
| P A | E | NF | L | O O |
| H 3 | 1 | 11 | 1 | 1 2 |

RBS ORF 6

ATTCATGAAAAAAGGAATAACTCATATGAATGAATAGATTTCATTTGGCTGGAGGTTTAGAAATGSSAAGAATAAAACCAAGATTACCATTCGTGTAG
 TAAGTACTTTTTTCTTATTGAGTATACTTACTTATCTAAGTATAACCGACCTCCAAATCTTACCCTTCTTATTTTGGTTCTAATGGTAAGACAATC

i h e k k e . l i . m ' n r f i l a g g l e m g r i k t k i t i l l v
 f m k k r n n s y e . i d s y w l e v . k w e e . k p r l p f c .
 s . k k g i t h m n e . i h i g w r f r n g k n k n q d y h s v s
 i . s f f s y a m h i f l n m n a p p k s i p l i f v l i v m r n
 n m f f l f l e y s h i s e y q s s t . f h s s y f g l n g n q .
 . e h f f p i v . i f s y i . i p q l n l f p f f l f w s . w e t l

| | | | | |
|---|---|---|-------|-------|
| R | A | F | BSB M | KEF M |
| S | L | O | SES M | SAD M |
| A | U | K | ACA L | PRK L |
| 1 | 1 | 1 | J1J 1 | 211 1 |

TGCTTTTGGCTTTTACTTGCAGGCGGTTATATGTACATAAATGATTTGAGCTGAAGGATGTTCCGACAGCAATTGGACAAACCTTGCTCCTCGGAAGAAGA
 ACGAAACGAAAAATGAACGTCGCGCAATATACATGTATTACTATAACTCGACTTCTACAAGGCTGTCGTTAACCTGTTTGGAACAGGAGCCTTCTTCT

l l l l l a g g y m y i n d i e l k d v p t a i g q t l s s e e e
 c f c f y l q a v i c t . m i l s . r a f r q q l d k p c p r k k r
 a f a f t c r r l y v h k . y . a e g c s d s n w t n l v l g r r
 t s k s k s a p p . i y m f s i s s f s t g v a i p c v k d e s s s
 h k q k . k c a t i h v y i i n l q l i n r c c n s l g q g r f f
 a k a k v q l r n y t c l h y q a s p h e s l l q v f r t r p l l

| | | | | |
|----------|---|---|---|---|
| H M E AS | N | D | N | M |
| B B CPC | A | D | L | B |
| O O R YR | E | E | A | O |
| 2 2 2 11 | 3 | 1 | 3 | 2 |

GGAATACACCATCCAGGAATATAAAGTGACGAAAAATGACGGCTCAGAGTATCATGGAGTAGCAGAAAAACGGAACGAAAAATCATCTTCAACGGAAAAAAA
 CCTTATGTGGTAGGTCCTTATATTTCACTGCTTTTAACTGCCGAGTCTCATAGTACCTCATCGTCTTTTGCCTTGCTTTTAGTAGAAGTTGCCCTTTTTT

e y t i q e y k v t k i d g s e y h g v a e n g t k i i f n g k k
 n t p s r n i k . r k l t a q s i m e . q k t e r k s s s t e k n
 g i h h p g i . s d e n . r l r v s w s s r k r n e n h l q r k k i
 s y v m u s y l t v f i s p e s y . p t a s f p v f i m k l p f f
 l f v g d l f i f h r f n v a . l i m s y c f v s r f d d e v s f f
 p i c w g p i y l s s f q r s l t d h l l l f r f s f . r . r f f

FIGURE 3B

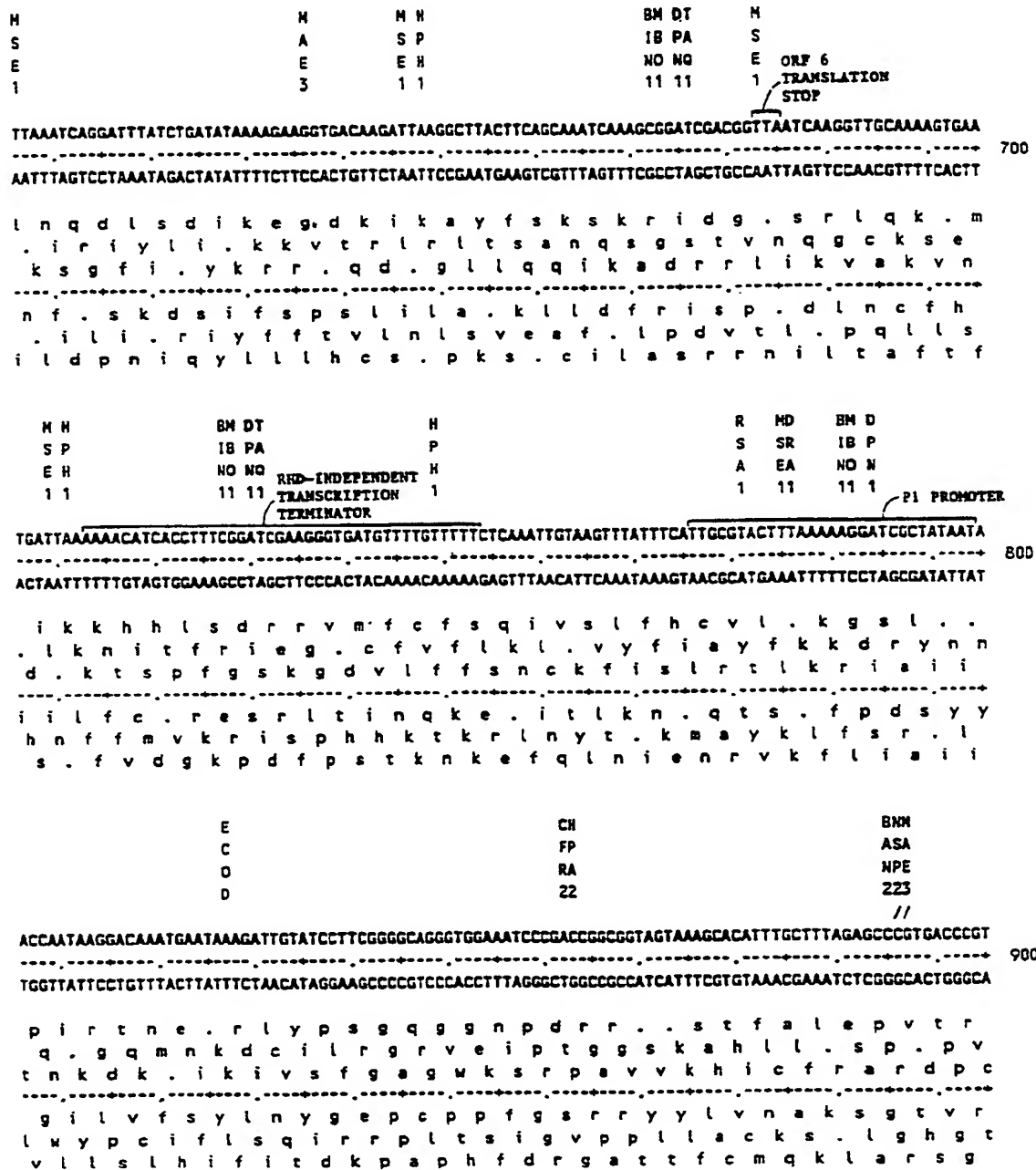


FIGURE 3C

T D H M A
H R N S L
A A F E U
1,3 1 1 1

F F F MD
O N O SR
K U K EA
1 H 1 11

GTGCATAAGCACCGCGTGGATTCAAGTTAAGCTGAAGCCGACAGTGAAGTCTGGATGGGAGAAGGATGATGAGCCGCTATGCAAAATGTTTAAAAATGC
CACGTATTCGTGGCCACCTAAGTCAAAATTCGACTTCGGCTGTCACTTTACAGCCTACCCCTCTTCTACTACTCGGGGATACGTTTTACAAATTTTACG

1000

v h k h a v d s v . a e a d s e s l d g r r m m s r y a k c l k m h
c i s t r w i q f k l k p t v k v w a g e g . . a a m q n v . k c
a . a r g g f s l s . s r q . k s g w e k d d e p l c k m f k n a
t c l c a t s e t . a s a s l s l r s p l l i i l r . a f h k f i
h m l v r h i . n l s f g v t f t q i p s p h h a a i c f t . f h
h a y a r p p n l k l q l r c h f d p h s f s s a g s h l i n l f a

NA H H M M
SV N N N N
IA F F L L
13 3 RHO-INDEPENDENT 3 1 1
/ TERMINATOR XBS

ATAGTGTATTTCTATTGCGTAAATACCTAAAGCCCGCAATTTTTATAAATTCGGGCTTTTTGACGGTAATAACAAAAGAGGGGAGGGAACAA
TATCACAATAAAGGATAACGCATTTTATGGATTTCGGGCTTAAAAATATTTAAGCCCGAAAAAACTGCCATTTATGTTTTCTCCCTCCCTTTGTT

1100

s v i s y c v k y l k p r i f y k f g a f l t v n n k r g e g n k
i v l f p i a . n t . s p e f f i n s g l f . r . i t k e g r e t n
. c y f l l r k i p k a p n f l . i r g f f d g k . q k r g g k q
c l t i e . q t f y r f g r i k . l n p a k k v t f l l l p s p f l
m t n n g i a y f v . l g s n k i f e p s k q r y i v f s p l s v
y h . k r n r l i g l a g f k k y i r p k k s p l y c f l p p f c

KE M A HHD XHHD
SA 3 L AAD HGBP
PR O U EEE OLDN
21 2 1 131 2211
/ ORF 5 / ///

HEH H HH
NCN I HA
FPF N AE
311 P 12

ATGGAAGAGTATTATATGAAGCTGGCCTTAGATCTTGCGAAGCAGGGCGAAGGACAGACCGAATCCAATCCGCTCGTCGGCGCTGTTGTCTGTAAGGAGC
TACCTTCTCATAATATACTTCGACCGGAATCTAGAACGCTTCGTCGGCTTCTGTCTGCTAGGTTAGGCGAGCAGCCGGGACAAACAGCATTTCCTGC

1200

w k s i i . s w p . i l r s r a k d r p n p i r s s a l l s . r t
g r v l y e a g l r s c e a g r r t d r i q s a r r r c c r k g r
m e e y y m k l a l d l a k q g e g q t e s n p l v g a v v v k d g
h f l i i h l q g . i k r l l a f s l g f g i r e d a s n d y l v
f p l t n y s a p r l d q s a p r l v s r i u d a r r r q q r l p r
i s s y . i f s a k s r a f c p s p e v s d l g a t p a t t t f s

FIGURE 3D

| | | | | | | | | |
|-------------|---|-----|---|----|---|-----|----|-----|
| BNANHBHH MD | A | HNF | N | NB | B | MHN | NW | B N |
| AAHLASHI SR | L | PLD | L | DS | S | NGS | SL | A L |
| NRAAEAN EA | U | HAK | A | ET | T | LIP | PA | N A |
| 1124211P 11 | 1 | 131 | 3 | 1X | X | 1A2 | H3 | 1 4 |

// /// // / /

GACAAATTGTCGGAATGGCGGCCCATTTAAATATGGTGAAGCTCATGCAGAAGTTCATGCCATCCATATGGCTGGAGCACATGCAGAGGCTGCCGACAT

 CTGTTTAAACAGCCTTACCCGCGGTAAATTTTATACCACCTTCGAGTACGCTCTTCAAGTACGGTAGGTATACCGACCTCGTGTACGTCTCCACGGGTGTA 1300

d k l s e w a p i . n m v k l m q k f m p s i w l e h m q r v p t f
 t n c r n g r p f k i w . s s c r s s c h p y g w s t c r g c r h
 q i v g m g a h l k y g e a h a e v h a i h m a g a h a e g a d i

 s l n d s h a g m . f i t t f s m c f n m g d m h s s c m c l t g v
 v f q r f p r g n l i h h l e h l l e h u g y p q l v h l p h r c
 p c i t p i p a w k f y p s a . a s t . a m w i a p a c a s p a s m

| | | | | | |
|-----|---|---|---|---|-----|
| HBM | T | F | B | N | XMM |
| ASA | A | N | B | L | HBA |
| EAE | O | U | V | A | OOM |
| 213 | 1 | H | 1 | 3 | 211 |

/ //

TTACGTTACACTCGAACCGTGCAGCCATTACGGAAAAACACCGCCATGTGCAGAATTGATTATCAACTCTGGTATCAAAAGAGTGTTCGTGGCGATGAGA

 AATGCAATGTGAGCTTGGCAGCTCGGTAAATGCCCTTTTGTGGCGGTACACGTCTTAACCTAATAGTTGAGACCATAGTTTCTCACAAGCACCGCTACTCT 1400

t l h s n r a a i t e k h r h v . q n . l s t l v s k e c s w r . e
 l r y t r t v q p l r k n t a m c r i d y q l w y q k s v r g d e r
 y v t l e p c s h y g k t p p c a e l i n s g i k r v f v a m r

 n v n c e f r a a m v s f e r w t c f q n d v r t d f s h e h r h s
 k r . v r v t c g n r f f v a m h l i s . . s q y . f l t r p s s
 . t v s s g h l w . p f v g g h a s n i l e p i l l t n t a i l

| | | | | | | | |
|------|------|------|-----|----|---|------|----------|
| D BM | M KE | BM D | M N | AM | F | E AS | S E EASH |
| P IA | N SA | IB P | B L | LN | O | C PC | F C CPCN |
| N NM | L PR | NO N | O A | UL | K | R YR | A R PYRL |
| 1 11 | 1 21 | 11 1 | 2 3 | 11 | 1 | 2 11 | N 2 1111 |

/ / RBS / ///

GATCCTAATCCGCTTGTGGCTCGAAGAGGGATCAGCATGATGAAAGAAGCTGGCATTGAGGTAAAGGAAGGCATCCTGGCAGACCGAGCGGAGAGGCTGA

 CTAGGATTAGGCGAACACCGACCTTCTCCCTAGTCGTAAGTCTTCTTCGACCGTAACCTCATTCCTTCCGTAGGACCGTCTGGTCCGCTCTCCGACT 1500

i l i r l w l e e g s a . . k k l a l r . g k a s w q t r r r g .
 s . s a c g w k r d q h d e r s w h . g k g r h p g r p g g e a e
 d p n p l v a g r g i s m m k e a g i e v r e g i l a d q a e r l n

 i r i r k h s s s p d a h h f f s a n l y p f a d q c v l r l p q
 l d . d a q p q f l s . c s s l l q c q p l p l c g p l g p p s a s
 s g l g s t a p l p i l m i f s a p m i t l s p m r a s w a s l s

FIGURE 3E

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----|----|-----|---|---|---|---|----|---|---|
| X | M | SNH | SS | RHM | B | F | F | B | A | H | M |
| M | N | TAA | PP | SAA | B | N | N | G | L | G | A |
| N | L | UEE | LL | AEE | V | U | U | L | U | E | E |
| 1 | 1 | 113 | 11 | 123 | 1 | H | H | 1 | 12 | 3 | 3 |

//

ATGAAAAATTTCTGCACCTTTATGAGGACAGGCCTTCCGTACGTACGCTAAAAGCGGCTGCCAGCCTTGACGGCAAGATAGCTACCAGCAGGGGTGACAG
 TACTTTTAAAGACGTGAATACTCCTGTCCGGAAGGCATGCAGTCCGATTTCGCGACGCTCGGAACCTGCCGTTCTATCGATGGTGGTCCCACTGTC

m k n f c t l . g q a f r t s r . k r l p a l t a r . l p a r v t a
 . k i s a l y e d r p s v r h a k s g c q p . r q d s y q h g . q
 e k f l h f a r t g l p y v t l k a a a s l d g k i a t s t g d s
 i f f k q v k h p c a k r v d r . f r s g a k v a l y s g a r t v
 h f i e a s . s s l g e t r . a l l p q u g q r c s l . w c p h c
 f s f n r c k i l l v p r g y t v s f a a a l r s p l i a v l v p s l

| | | | | |
|---|---------|-----|----|---|
| T | HBMDMBH | AFS | ED | F |
| T | PIBPBBA | LNF | SD | O |
| H | HNOMLVE | WJA | PE | K |
| 2 | 1111112 | NHN | 11 | 1 |

//

CAAATGGATCACGTGACAGGCTGCAAGACAGGATGCTCAGCAATACAGGAAAAACACCAAGCATTCTAGTCCGAGTTGGCACAGTGAAGCCGACAAT
 GTTTACCTAGTGCACTCTCCGACGTTCTGTCTACGAGTCGTTATGTCTTTGTGTGGTTTCGTAATAACAGCCTCAACCGTGTCACCTTCGGCTGTTA

n g s r q r l q d r m l s n e g k h t k a f . s e l a q . k p t i
 q a d h v r g c k t g c s a i q e n t p k h f s r s w h s e s r q s
 k w i t s e a a r q d a q q y r k t h q s i l v g v g t v k a d n
 a f p d r . l s c s l i s l l v p f c v l a n . d s n a c h f g v i
 c i s . t l p q l v p h e a i c s f v g f c k l r l q c l s l r c
 l h i v d s a a l c s a . c y l f v c w l m k t p t p v t f a s l

| | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|----|---|-----|----|---|---|
| AM | P | B | H | M | CH | R | THH | MD | H | H |
| LS | S | S | N | A | FP | S | ANN | SD | G | B |
| UE | T | P | F | E | RA | A | QLF | TE | A | O |
| 11 | 1 | 1 | 3 | 3 | 22 | 1 | 111 | 21 | 1 | 1 |

CCGAGETTAACCTGCAGACTGCCGAATGTAACAAAACAGCCGGTTCGGGTCTACTTGATACCGTACTCTCGATTCTGAGGACGCTAAAGTGATTTCGG
 GGCTCGAATTGGACGTCTGACGGETTACATTGTTTGTCCGCCAAGCCAGTATGAACATGGCATGAGAGCTAAGGACTCCTCGGATTTCACATAACGC

r a . p a d c r m . q n s r f g s y l i p y s r f l r t l k . f a
 e l n l q t a e c n k t a g s g h t . y r t l d s . g r . s d l r
 p s l t c r l p n v t k q p v r v i l d t v l s i p e d a k v i c d
 r a . g a s q r i y e f l r n p d y k i g y e r n r l v s f h n a
 d s s l r c v a s h l l v a p e p . v q y r v r s e q p r . l s k r
 g l k v q l s g f t v f c g t r t m a s s v t s e i g s s a l t i q

FIGURE 3F

| | | | | |
|---|------|---|------|---|
| D | H HH | N | THM | A |
| P | I HA | L | HHM | L |
| N | N AE | A | AMAL | U |
| 1 | P 12 | 3 | 1P11 | 1 |

//

ATCAATAGCGCCGACATGGATTTTACGACGCCACGCCAGACGAGGAAAAGAAAAACGGTTTCAGCTTTCGGAGTGAACATATTTACACTTGAAC
TAGTTTATCGCGGCTGACCTAAAAATGCTGCCGTGGCGCTCTGCTCCTTTCTTTTTCGCCAAAGTCAAAGCCTCACTTGTATAAATGTGAACCTTG

1900

ik . r r h g f l r r h a q t r k r k n g f q l s e . t y l h l k p
s n s a d m d f y d g t r r r g k e k t a f s f r s e h i y t . n
q i a p t w i f t t a r a d e e k k k r l s a f g v n i f t l e t
i l y r r c p n k r r c a c v l f l f f p k . s e s h v y k c k f
d f l a s m s k . s p v r l r p f s f v a k l k r l s c i . v q f
s . i a g v h i k v v a r a s s s f f f r s e a k p t f m n v s s v

| | | | | |
|------|----------|-----|-----|-----|
| H HB | XMD BM M | MNS | PNA | H A |
| I HS | HBP IA B | BLF | VSL | IL |
| N AM | CON NE O | OAA | UPU | NU |
| P 11 | 211 11 2 | 23N | 2B1 | 31 |

//

CGAGCGCATTCAAATTCCTGATGTTTTGAAGATCCTAGCGGAAGAGCGCATCATGTCGGTGTATGTGGAAGCGGTTCACTGTTTCACGGAAGCTTTGTC
GCTCGCGTAAGTTTAAGGACTACAAAACCTCTAGGATCGCCTCTTCCTAGTAGACAGCCACATACACCTTCGCCAAGTCCACAAAGTGCCTTCGAAACAG

2000

s a f k f l m f . r s . r k k a s c r c m w k a v q l f t e a l s
r a h s n s . c f e d p a g r r h h v v v c g r r f s c s r k l c q
e r i q i p d v l k i l a e e g i m s v y v e g g s a v h g s f v
g l a n l n r i n q l d . r f f a d h r h i h f a t . s n v s a k d
r a c e f e q h k s s g l p l c . t p t h p l r n l q e r f s q
s r m . i g s t k f i r a s s p m m d t y t s p p e a t . p l k t

| | | | | | | |
|---|---|-----|----|---|---|---|
| M | M | SNH | AM | N | X | H |
| B | N | PSL | LS | P | N | P |
| O | L | HPA | UE | A | N | H |
| 2 | 1 | 1H3 | 11 | 2 | 1 | 1 |

//

AAAGAAGGCTGTTTTCAAGAAATCATCTTCTATTTTGCCTTAACTAATCGGAGCAACCATGCTCCAGCTTAATCTCGGTGAAGGTTTTCAATCAA
TTTCTTCGACAAAAGTTCTTTAGTAGAAGATAAAACGGGGATTGATTAGCCTCCTTGCGTACGAGGGTCAATTAGAGGCCACTTCCAAAAGTTAGTT

2100

kkavfkks silpln . seermlpa . spvkvf nq
rrlfsrnhllfcp . tnrrnacsqlnlr . rfsin
kegc f q e i i f y f a p k l i g g t h a p s l i s g e g f q s m
ffatklfddeikgrf . dssrm sga . dgtftkl .
llsnelf . rrrnqg . vlrlfahevs lrrhlneil
lspqk . simk . kaglsippvcaglk iepspk . d

FIGURE 3G

| | | | | | | |
|---|--|-------|---|--|----|----|
| F | | XGGCH | E | | BM | FN |
| 1 | | MODFA | C | | SA | OL |
| N | | AIIRE | R | | TE | KA |
| 1 | | 32213 | V | | E3 | 13 |

ORF 5 TRANSLATION
STOP RBS ORF 4

////

TGAAAGATGTCCTTATTACAATTCAGTGATATAACCCAAATCGGCGTGATATCAAACTGACGGGAAAACCGACAAAGGAATAGGATGGTGACCATGT

 ACTTCTACAGGGGAATAATGTTAAGTGACTATATTGGGTTAGCGGCACTATAGTTGACTGCCGTTTGGCTGTTTCCTTATCCTACCACTGGTACA 2200

. k m s p y y n s l i . p k s a v i s n . r q n r q r n r m v t m f
 e r c p l i t i h . y n p n r p . y q t d g k t d k s i g w . p c
 k d v p l l q f t d i t q i g r d i k l t a k p t k e . d g d h v

 h f i d g . . l e s i y g l d a t i d f q r c f r c l f l i t v m
 s l h g r i v i . q y l g f r g h y . v s p l v s l p i p h h g h
 i f s t g k n c n v s i v w i p r s i l s v a f g v f s y s p s w t

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|-----|---|-----|------|---|---|---|---|
| H | T | M | THH | N | SNM | HHM | M | M | M | H |
| P | A | B | ANW | L | PSL | AA S | S | N | A | A |
| H | Q | O | OFF | A | HPA | EE E | E | L | M | H |
| 1 | 1 | 2 | 131 | 3 | 1H3 | 13 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

////

TTACAGGAATTATCGAAGAAACAGGCACAATCGAATCCATGAAAAAGCAGGGCATGCAATGGCCTTAACATTAATGCTCAAAGATTTAGAGGATGT

 AATGTCCTTAATAGCTTCTTTGTCGGTGTTAGCTTAGGTACTTTTTCGTCGGCTACGTTACCGGAATTGATAATTTACGAGTTTCTAAAATCTCCTACA 2300

t g i i e e t g t i e s m k k a g h a m a l t i k c s k i l e d v
 l q e l s k k q a q s n p . k k q g m q u p . l l n a q r f . r m f
 y r n y r r n r h n r i h e k s r a c n g l n y . m l k d f r g c

 n v p i i s s v p v i s d a f f a p c a i a k v i l h e f i k s s t
 k c s n d f f c a c d f g h f f c p m c h g . s n f a . l n . l i
 . l f . r l f l c l r i w s f l l a h l p r l . . i s l s k l p h

| | | | | |
|---|--|---|--|---|
| F | | M | | F |
| O | | A | | O |
| X | | E | | K |
| 1 | | 3 | | 1 |

TCATCTTGGCGACAGCATTGCAGTGAACGGCATTGTCTGACTGTCACTGATTTTACAAAAATCAATTCACAGTGGATGTTATGCCTGAACAGTCAAA

 AGTAGAACCGCTGTGCTAACGTCACCTTGGCGTAAACAGACTGACAGTGACTAAAATGTTTTTAGTTAAGTGTCACCTACAATACGGACTTTGTCASTTT 2400

h l g d s i a v n g i c l t v t d f t k n q f t v d v m p e t v k
 i l a t a l q . t a f v . l s l i l q k i n s q w m l c l k q s k
 s s w r q h c s e r h l s d c h . f y k k s i h s g c y a . n s q s

 . r p s l m a t f p m q r v t v s k v f f . n v t s t i g s v t l
 n m k a v a n c h v a n t q s d s i k c f i l e c h i n h r f c d f
 e d q r c c q l s r c k d s q . q n . l f d i . l p h . a q f l .

FIGURE 3H

| | | | | | | | | | | | | |
|---|----|--|---|--|---|--------|----|--|---|---|----|----|
| A | MM | | M | | F | XGGCHM | HH | | D | B | HH | NS |
| L | AA | | S | | N | MODFAN | AA | | D | S | AA | LA |
| U | EE | | E | | U | ATIREL | EE | | E | M | EE | AL |
| 1 | 23 | | 1 | | H | 322131 | 13 | | 1 | 2 | 13 | 31 |

/////

/

/

GCTACGTCACTGAATGATTTAAACAAAAGGAAGCAAAGTAAATCTGGAAGAGCGATGGCGGCAACGGCGTTTCGGAGGCCATTTGGTCTCAGGCCATG

2500

CGATGCAGTGACTTACTAAATTGTTTCCTTCGTTTCATTTAGACCTTTCTCGCTACGGCGTTTGGCGCAAGCCTCCGGTAAAGCAGAGTCCGGTAC

a t s l n d l t k g s k v n l e r a m a a n g r f g g h f v s g h v
 l r h . m i . q k e a k . i w k e r w r q t a v s e a i s s q a m
 y v t e . f n k r k q s k s g k s d g g k r p f r r p f r l r p c
 a v d s f s k v f p l l t f r s l a i a a f p r k p p w k t e p w
 s r . q i i . c f s a f y i q f s r h r c v a t e s a m e d . a m
 l . t v s h n l l l f c l l d p f l a p p l r g n r l g n r r l g h

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----|--|---|----|--|----|--|----|-----|--|---|---|--|----|
| AHT | | H | KE | | SH | | MD | AAM | | M | E | | MD |
| CIA | | N | SA | | PB | | SR | VSL | | S | C | | SR |
| CNQ | | F | PR | | OO | | EA | AUA | | E | O | | EA |
| 121 | | 3 | 21 | | 12 | | 11 | 214 | | 1 | D | | 11 |

-22 PROMOTER

TCGACGGAACGCGGAATCACACGAATTGAAGAGAAAAGCAACGCAGTTTACTATGATTTAAAAATGGACCGCTCATTACAAAAACATTGGTTTTAAA

2600

AGGTGCCCTTGACGCCCTTAGTGCTTAACCTCTCTTTTGGTTCGCTCAAATGATACTAAATTTTACCTGGGCAGTAATTGTTTTGTAAACCAAAATTT

d g t a e i t r i e e k s n a v y y d l k m d p s l t k t l v l k
 s t e l r k s h e l k r k a t q f t m i . k w t r h . q k h w f . r
 r r n c g n h t n . r e k q r s l l . f k n g p v i n k n i g f k
 t s p v a s i v r i s s f l l a t . . s k f l s g d n v f v n t k f
 d v s s r f d c s n f l f a v e n v i i . f h v r . . c f c q n .
 r r f q p f . v f q l s f c r l k s h n l f p g t m l l f m p k l

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|--|---|----|--|----|---|---|--|---|------|---|--|-----|--|-----|
| BH D | | A | FH | | HH | - | B | | M | MM D | M | | MD | | MD |
| IS P | | L | OS | | NA | | B | | A | BB P | S | | B P | | B P |
| NO N | | U | KE | | FE | | V | | E | OO N | E | | ON | | ON |
| 11 1 | | 1 | 11 | | 33 | | 2 | | 3 | 21 1 | 1 | | 11 | | 11 |

GGGATCAATTACTGTGGATGGCGTGAGCTTAACCATATCGGCCTGACAGAAGACACAGTGACGATCTCCTTAATACCGCATACGATCAGCGAAACGATC

2700

CCCTAGTTAATGACACCTACCGCACTCGAATTGGTATAAGCCGGACTGTCTTCTGTGTCACTGCTAGAGGAATTATGGCGTATGCTAGTCGCTTTCCTAG

g s i t v d g v s l t i f g l t e d t v t i s l i p h t i s e t i
 d q l l w m a . a . p y s a . q k t q . r s p . y r i r s a k r s
 g i n y c g w r e l n h i r p d r r h s d d l l n t a y d q r n d l
 p d i v t s p t l k v m n p r v s s v t v i e k i g e v i l s v i
 l s . n s h i a h a . g y e a q c f v c h r d g . y r m r d a f r d
 p i l . q p h r s s l w i r g s l l c l s s r r l v a y s . r f s

FIGURE 31

| | | | | |
|------|----|------|----|---|
| M DP | TH | B MD | CT | E |
| B PV | AN | S BP | LA | C |
| O NU | QF | M ON | AQ | P |
| 1 11 | 13 | 1 11 | 11 | 1 |

TTTTCAGAAAAACGATCGGCTCTAAAGTGAATATCGAATGCGATATGATCGGAAAAATATATGTATCGATTTTTCATAAAGCCAATGAAAAAAGACCC
 AAAAGTCTTTTTCGTAGCCGAGATTTCACTTATAGCTTACGCTATACTAGCCTTTATATACATAGCTAAAAACGTATTTTCGTTACTTTTATCTGGG

2800

f s e k t i g s k v p i e c d m i g k y m y r f l h k a n e n k t q
 f q k k r s a l k . i s n a i . s e n i c i d f c i k p m k i r p
 f r k n d r l . s e y r m r y d r k i y v s i f a . s q . k . d p
 k e s f v i p e l t f i s h s i i p f y i y r n k c l a l s f l v
 k . f f r d a r f h i d f a i h d s f i h i s k q m f g i f i l g
 r k l f f s r s . l s y r i r y s r f i y t d i k a y l w h f y s g

| | | | | | | |
|---|----|---|---|-----|---|------|
| T | AM | M | F | MHN | M | MD H |
| T | FS | N | O | BSL | S | SR G |
| H | LE | L | K | OPA | O | EA A |
| 2 | 21 | 1 | 1 | 2H3 | 2 | 11 1 |

AACAAACCATTACAAAAGCCTTCTTAAGCGAAAACGGCTTTTAGAGAGGAAGATTTCATGTTTCATCCGATAGAAGCAAGCACTGGACGCTTTAAAAAAA
 TTGTTTGGTAATGTTTTCGGAAGAATTCCGCTTTTCCGAAAATCTCTCCTCTCTAAACGTACAAAGTAGGCTATCTTCTTCGTGACCTGCGAAAATTTTTT

2900

q t i t k a f l s e n g f . r g r f a c f i r . k k h w t l . k k
 n k p l q k p s . a k t a f r e e d l h v s d r r s t g r f k k r
 t n h y k s l l k r k r l l e r k i c m f h p i e e a l d a l k k
 w c v m v f a k k l s f p k . l p l n a h k m r y f f c q v s . f f
 l l g n c f g e . a f v a k l s s s k c t e d s l l l v p r k l f
 v f w . l l r r l r f r s k s l f i q a n . g i s s a s s a k f f

| | | | | | |
|---|---|---|-----|---|---|
| B | M | B | SNM | M | M |
| B | B | S | PSL | P | S |
| V | O | M | HPA | A | E |
| 2 | 2 | 2 | 1H3 | 2 | 1 |

GGCGAAGTCATCATCGTTGTATGATGAAGACAGAGAAAATGAAGGAGACTTTGTGGCTCTTCCGAGCATGCAACGCCGGAAGTCATTAACCTTTATGG
 CCGCTTCAGTAGTAGCAACATCTACTACTTCTGTCTCTTTTACTTCTCTGAAACACCGAGAACGGCTCGTACGTTGCGGCTTCAGTAATTGAATACC

3000

a k s s s l . m m k t e k m k e t l w l l p s m q r r k s l t l w
 r s h h r c r . . r q r k . r r l c g s c r a c n a g s h . l y g
 g e v i i v v d d e d r e n e g d f v a l a e h a t p e v i n f m a
 a f d d d n y i i f v s f i f s v k h s k g l m c r r f d n v k h
 l r l . . r q l h h l c l f h l l s q p e q r a h l a p l . . s . p
 p s t m m t t s s s s l s f s p s k t a r a s c a v g s t m l k i

FIGURE 3J

| | | | | |
|-----|-----|------|---------|-------|
| M N | MD | FD | M HMD | PH H |
| N L | BP | NN D | B PBP | LP N |
| L A | ON | UL E | O HON | EH F |
| 1 3 | 1 1 | H1 1 | 2 1 1 1 | 1 1 1 |

CGACACATGGGAGAGGACTGATCTGCACGCCGCTCAGTGAGGAAATCGCAGACAGGCTTGATCTTCACCCATGGTTGAGCATAATACAGACTCTCACCA
 GCTGTGTACCCCTCTCCTGACTAGACGTGCGCGGAGTCACCTCTTAGCGTCTGTCCGAAGTGAAGTGGGATACCAACTCGTATTATGTCTGAGAGTGGT 3100

r h m g e d . s a r r ' s v r k s q t g l i f c l w l s i f q t l t t
 d t w e r t d l h a a q . g n r r q a . s s p y g . a . y r l s p
 t h g r g l i c t p l s e e i a d r l d l h p m v e h n t d s h h
 r c m p s s q d a r r e t l f d c v p k i k v r h n l m i c v r v
 s v h s l v s r c a a . h p f r l c a q d e g . p q a y y l s e g
 a v c p l p s i q v g s l s s i a s l s s r . g i t s c l v s e . w

| | | | | |
|---|---|--------|------|---|
| E | B | M HEHH | XBMD | T |
| C | B | B ICHA | HGBP | T |
| P | V | O N4AE | OLON | H |
| 1 | 2 | 2 P712 | 2211 | 2 |

///

CACTGCATTACCGTAAGCATAGACCATCGTGAACGAAGACAGGTATCAGCGCTCAAGAAAGATCTTTTACCGTTCAAGCATTGCTGGACAGCAATCC
 GTGACGTAATGGCATTGCTATCTGGTAGCACTTTGCTTCTGTCCATAGTGGGAGTTCTTTCTAGAAAATGGCAAGTTCGTAACGACCTGTCGTTTAGG 3200

l h l p . a . t i v k r r q v s a l k k d l l p f k h c w t a n p
 h c i y r k h r p s . n e d r y q r s r k i f y r s s i a g q q i r
 t a f t v s i d h r e t k t g i s a q e r s f t v q a l l d s k s
 v s c k g y a y v m t f r l c t d a s l f s r k g n l c q q v a f g
 c q m . r l c l g d h f s s l y . r e l f i k . r e l m a p c c i
 v a n v t l m s u r s v f v p i l a . s l d k v t . a n s s l l d

| | | | | | | |
|---|--------|---|---|----------|-----|-----|
| H | BHNSB | M | M | KN HTASH | AAF | EMD |
| G | SPCCES | S | N | SI HHSBA | LLN | CBP |
| A | AAIRCA | P | L | PN AAUVE | WUJ | ION |
| 1 | J2111J | 2 | 1 | 1P 11113 | N1H | 511 |

///

GTGCCATCTGATTTTCAGCGTCCGGGGCACATTTTCCACTGATTGCGAAAAAGGAGGTGTCCTGAAAAGCGCGGGCCATACAGAACCTGCTGTTGATC
 CACGGTAGACTAAAAGTCCGAGGCCCGGTGTAAAAAGGTGACTAACCGCTTTTCTCCACAGGACTTTTCGGCGCCGGTATGCTTCGACGACAACCTAG 3300

c h l i f s v r g t f f h . l r k k e v s . k a r a i q k l l l i
 a i . f s a s g a h f s t d c e k r r c p e k r g p y r s c c . s
 v p s d f q r p g h i f p l i a k k g g v l k s a g h t e a a v d l
 h v r i k l t r p v n k w q n r f f s t d q f a r a m c f s s n i
 r a m q n e a d p a c k e v s q s f l l h g s f r p g y l l q q q d
 t g d s k . r g p c m k g s i a f f p p t r f l a p w v s a a t s

FIGURE 3K

| | | | | | | | |
|-----|------|------|--------|---|---|---|--------|
| H A | BXND | EHAS | NCHN A | B | M | O | A SHBN |
| I L | INBP | CGPC | LFPA H | B | B | O | L SGAS |
| N U | NOON | RAYR | ARAE A | V | O | E | U TINP |
| 3 1 | 1211 | 2111 | 4221 2 | 2 | 2 | 1 | 1 1A22 |

/ / /
 TTGCTGAAGCTTGCGGATCTCCAGGAGCGCGCTCATTGTGAAATTATGAATGAAGACGGGACGATGGCGAGTGCCTGAGCTCATTGAAATTGCGAA

 ACGGACTTCGAACGCTAGAGGTCTCGGCGGAGTAAACACTTTAATACTTACTTCTGCTTGTACCGCTCTCAGGACTCGAGTAACTTTAAGCTT

3400

l l k l a d l q e p a s f v k l . m k t e r w r e c l s s l k l r k
 c . s l r i s r s r r h l . n y e . r r n d g e s a . a h . n c e
 a e a c g s p g a g v i c e i m n e d g t m a r v p e l i e i a k

 k s f s a s r w e g a d n t f n h i f v s r h r s h r l e n f n r
 q q l k r i e l l r r . k h f . s h l r f s p s l a q a . q f q s
 r a s a q p d g p a p t m q s i i f s s p v i a l t g s s m s i a f

| | | | | | | | |
|------|-----|---|---|---|---|-----|---|
| H SH | BMD | M | H | M | T | B H | F |
| S FP | CBP | S | N | A | A | B I | N |
| E AH | LON | E | F | E | O | V N | U |
| 1 N1 | 111 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 2 | H |

/ /
 AAAGCATCAATTAAAAATGATCACCATTAAAGGATTTGATTCAATACCGTTACAATCTGACAACACTTGTGAGCGTGAAGTTGACATTACGCTGCCTACT

 TTTCTAGTTAATTTTACTAGTGGTAATTCCTAAACTAAGTTATGGCAATGTTAGACTGTTGTGAACAGCTCGCACTTCAACTGTAATCGGACGGATGA

3500

s i n . k . s p l r i . f n t v t i . q h l s s v k l t l r c l l
 k a s i k n d h h . g f d s i p l q s d n t e r a . s . h y a a y .
 k h q l k m i t i k d l i q y r y n l t t l v e r e v d i t l p t

 f l m l . f h d g n l i q n l v t v i q c c k d l t f n v n r q r s
 f a d i l f s . w . p n s e i g n c d s l v q r a h l q c . a a .
 f c . n f i i v m l s k i . y r . l r v v s t s r s t s m v s g v

| | | | |
|-----|---|----|-----|
| F M | M | NH | HCH |
| I S | N | SL | GFP |
| N E | L | PA | ERA |
| 1 1 | 1 | H3 | 222 |

/
 GATTTTGGGACATTTAAGGTTTATGCATACACAAATGAGGTAGATGGAAAAGAGCATGTCCGATTTGTGATGGGAGATGTGCCGTTCCGAGAGAAGAACCGG

 CTAAACCCCTGTAAATTCCAAATACCTATGTGTTTACTCCATCTACCTTTTCTCGTACAGCGTAAACACTACCTCTACAGCGCAAGCCTCTTCTTGGCC

3600

i l g h l r f m d t q m r . m e k s m e h l . w e m c r s e k n r
 f w d i . g l w i h k . g r w k r a c r i c d g r c a v r r r t g
 d f g t f k v y g y t n e v d g k e h v a f v m g d v p f g e e p v

 i k p c k l n i s v c i l y i s f l m d c k . h h s i h r e s f f r
 q n q s m . p k h i c l h p l h f l a h r m q s p l h a t r l l v p
 s k p v n l t . p y v f s t s p f s c t a n t i p s t g n p s s g

FIGURE 3L

| | | | | | | | |
|----------|---|--------|---|-------|--------|--------|---|
| M AA HNS | B | B H MA | H | B RAA | F PHAF | FBTKHH | F |
| B VS PCC | S | S A AF | P | B SVS | N VSLN | NBNSHI | N |
| O AU AIR | M | M E EL | H | V RAU | U UPLU | UVAPAN | U |
| 2 21 211 | 1 | 2 3 23 | 1 | 1 221 | H 2B1H | H1111P | H |

/ / / / /
 TATTGGTCCGGGTGCATTGAGAATGTCTCACAGGTGACGTGTTTGGCTCTCATCGGTGATTGCGGACCGCAGCTGCACGCCGCGGTGAACCAAATTGC

 ATAACCAGGCCACGTAAGTCTTACAGAGTGTCCACTGCACAAACCGAGAGTAGCGACACTAACGCCCTGGCGTCGACGTGCGGCGGACTTGGTTTAACG

3700

y w s g c i q n v s g v t c l a l i a v i a d r s c t p r . t k l p
 i g p g a f r m s h r . r v w l s s l . l r t a a a r r a e p n c
 l v r v h s e c l t g d v f g s h r c d c g p q l h a a l n q i a

 y q d p h m . f t e c t v h k a r m a t i e s r l q v g r q v l n
 i p g p a n l i d . l h r t q s e d s h n r v a a a r r a s g f q
 t n t r t c e s h r v p s t n p e . r q s q p g c s c a a s f w i a

| | | | | | | | | |
|--------|----|---|----|---|----|---|----|----|
| HDOSBB | HN | R | HH | M | NS | M | HA | HA |
| ASSESS | GS | S | I | H | SF | S | IL | IL |
| EAACAA | IP | A | HA | L | EA | E | NU | NU |
| 3111JJ | A2 | 1 | P1 | 1 | 1N | 1 | 31 | 31 |

/ / / / /
 CGCAGAAGGCCGTGGAGTGCTCCTGTACTTGGCCCAAGAAGGACGAGGCATCGGTTTAATCAATAAATTAAAGCTTATAAGCTTCAGGAACAAGGCTAT

 CGGCTCTCCGGCACCTCACGAGGACATGAACGCGGTTCTTCTGCTCCGTAGCCAAATTAGTTATTTAATTTTGAATATTGGAAGTCTTGTTCGGATA

3800

q k a v e c s c t c a k k d e a s v . s i n . k l i s f r n k a m
 r r r p w s a p v l a p r r t r h r f n q . i k s l . a s g t r l .
 a e g r g v l l y l r q e g r g i g l i n k l k a y k l q e q g y

 g c f a t s h e q v q a l f s s a d t . d i f . f s i l k l f l a i
 r l l g h l a g t s a g l l v l c r n l . y i l l k y a e p v l s
 a s p r p t s r y k r w s p r p m p k i l l n f a . l s . s c p .

| | | | | | | | | | | |
|---|---|-----|----|---|-------|-------|-----|-----|-----|-----|
| M | B | HH | H | M | HBXMD | SHN | T | BSB | BHM | H |
| N | G | I | HA | N | B | PIHBP | FGS | H | SES | SPN |
| L | L | NAE | F | O | ANODN | AIP | A | ACA | PAL | N |
| 1 | 1 | P12 | 1 | 2 | 21211 | NA2 | 1 | J1J | 221 | 3 |

/ / / / /
 GACACCGTAGAAGCCAATGAGGCGGTTGGATTCTTGGCGGATCTTCGCAACTATGGCATCGGAGCACAAATTTACGCGACCTCGGTGTCCGGAATATGA

 CTGTGGCATCTTCGGTTACTCCGGAACCTAAGAAGCGCCTAGAAGCGTTGATACCGTAGCCTCGTGTAAAAATCGGCTGGAGCCACAGGCCTTATATCT

3900

t p . k p m r r l d a c r i f a t m a s e h k f y a t s v s g i .
 h r r s q . g a w i l a g s s q l u h r s t n f t r p r c p e y e
 d t v e a n e a l g f l p d l r n y g i g a q i l r d l g v r n m k

 v g y f g i l r k s e q r i k a v i a d s c l n . a v e t d p i h
 h c r l l u h p a q i r a p d e c s h c r l v f k v r g r h g s y s
 s v t s a l s a s p n k g s r r l . p m p a c i k r s r p t r f i

FIGURE 3M

| | | | | | | | | |
|---|---|---|-----|---|---|----|---|---|
| A | H | T | SHH | B | P | HD | F | M |
| L | N | H | TAA | G | L | ND | N | N |
| U | F | A | UEE | L | E | FE | U | L |
| 1 | 3 | 1 | 113 | 1 | 1 | 11 | H | 1 |

//

AGCTTTTGACGAATAATCCGCGAATAATCCGAGGCCTTGAAGGCTACGGACTCAGTATTTTCAGAAAGAGTGCCGCTTCAAATGGAGGCGAAAGAACACAA
 TCGAAACTGCTTATTAGGCGCTTTTACGCTCCGGAACCTCCGATGCCTGAGTCATAAAGTCTTTCTACGGCGAAGTTTACCTCCGCTTCTTGTGTT

4000

s f . r i i r e k s q a l k a t d s v f q k e c r f k w r r k n t i
 a f d e . s a k n r r p . r l r t q y f r k s a a s n g g e r t q
 l l t n n p r k i a g l e g y g l s i s e r v p l q m e a k e h n
 l k q r i i r s f d c a k f a v s e t n . f s h r k l h l r f f v
 a k s s y d a f f r l g q l s r v . y k l f l a e e f p p s l v c
 f s k v f l g r f i a p r s p . p s l i e s l t g s . i s a f s c l

| | | | | |
|---|----|---|----|-----|
| S | AM | M | MH | N F |
| S | LA | A | AN | D O |
| P | UE | M | MF | E X |
| 1 | 11 | I | 11 | 11 |

ORF 3 TRANSLATION STOP

RBS

B-RIBOFLAVIN SYNTHASE GENE

TAAAAATATTTGCAAAACCAAAATGAACAAGCTAGGTCATTTACTTCATTTCTAATCACAAATATCACAAAAAGGATGGGAATCATATGAATATCATAC
 ATTTTTTATAAACGTTTGGTTTTACTTGTTCGATCCAGTAAATGAAGTAAAGATTAGTGTTTATAGTGTTTTTCTACCCCTTAGTATACTTATAGTATG

4100

k n i c k p k . t s . v i y f i s n h k y h k k g w e s y e y h t
 . k i f a n q n e q a r s f t s f l i t n i t k k d g n h m n i i q
 k k y l q t k m n k l g h l l h f . s q i s q k r m g i i . i s y
 i f f i q l g f h v l . t m . k m e l . l y . l f p h s d y s y . v
 y f i n a f w f s c a l d n v e n r i v f i v f f s p f . i f i m
 l f y k c v l i f l s p . k s . k . d c i d c f l i p i m h i d y

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|-----|----|-----|-----|------|
| R | E | H | H | M | M B | AF | EDE | S B | H HF |
| S | C | S | N | S | B B | LN | SDC | F B | I HN |
| A | P | E | F | E | O V | UU | PE1 | A V | N AU |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 1 | 1H | 115 | N 1 | P 1H |

/

AAGGAAATTTAGTTGGTACAGGTCTTAAATCGGAATCGTAGTAGGAAGATTTAATGATTTTATTACGAGCAAGCTGCTGAGCGGAGCAGAAGATGCGCT
 TTCCTTTAAATCAACCATGTCCAGAATTTAGCCTTAGCATCATCCTTCTAAATTACTAAATAATGCTCGTTCGACGACTCGCCTCGTCTTCTACGGCA

4200

r k f s w y r s . n r n r s r k i . . f y y e q a a e r s r r c a
 g n l v g t g l k i g i v v g r f n d f i t s k l l s g a e d a l
 k e i . l v q v l k s e s . . e d l m l l r a s c . a e q k m r c
 l f n l q y l d . f r f r l l f i . h n . . s c a a s r l l l h a
 c p f k t p v p r l i p i t t p l n l s k i v l l s s l p a s s a s
 l s i . n t c t k f d s d y y s s k i i k n r a l q q a s c f i r

FIGURE 3N

| | | | | | | | | | | |
|----|---|---|----|----|----|---|---|---|---|---|
| MD | N | A | NE | AS | H | H | B | F | S | S |
| SD | L | C | LC | PC | I | H | B | N | O | F |
| OE | A | C | AR | YR | NA | V | | U | O | A |
| 21 | 3 | 1 | 42 | 11 | P | 1 | 1 | H | 1 | N |

GCTCAGACATGGCGTAGACACAAATGACATTGATGTGGCTTGGGTTCCAGGCGCATTGAAATACCGTTTGTGCGAAAAAATGGCGGAACAAAAAA
 CGAGTCTGTACCGCATCTGTGTTTACTGTAACACACCGAACCCAAAGGTCCGCGTAACTTTATGGCAACGACGCTTTTACCGCCTTGTGTTTTT

4300

a q t w r r h k . h . c g l g s r r i . n t v c c e k n g g n k k i
 l r h g v d t n d i d v a w v p g a f e i p f a a k k m a e t k k
 s d m a . t q m t l m w l g f q a h l k y r l l r k k w r k q k n
 a . v h r l c l h c q h p k p e l r m q f v t q q s f f p p f l f
 s l c p t s v f s m s t a q t g p a n s i g n a a f f i a s v f f
 q e s m a y v c i v n i h s p n w a c k f y r k s r f f h r f c f f

| | | | | | |
|----|-----|---|---|----|---------|
| NM | HH | E | B | AF | THN S F |
| SN | I H | C | B | LN | HTH F M |
| PL | NA | O | V | UU | ANA A U |
| 21 | P1 | D | 1 | 1H | 1P1 N H |

TATGATGCTATTATCACATTGGGCACTGTCTACAGAGCGCAACGACACATTACGATTATGTCTGCAATGAAGCTGCAAAAGGCAATGCGCAAGCAGCAA
 ATACTACGATAAATAGTGAACCGGTGACAGTAGTCTCCGCGTTGCTGTGTAATGCTAATACAGACGTTACTTCGACGTTTTCCGTAGCGCGTTGCTCGTT

4400

. c y y h i g h c h q r r n d t l r l c l q . s c k r h r a s s k
 y d a i i t l g t v i r g a t t h y d y v c n e a a k g i a q a a n
 m m l l s h w a l s s e a q r h i t i m s a m k l q k a s r k q q
 i h h . . . m p c q . . l r l s v n r n h r c h l q l l c r a l l l
 y s a i i v n p v t m l p a v v c . s . t q l s a a f p m a c a a
 i i s n d c q a s d d s a c r c m v i i d a i f s c f a d r l c c

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|-----|
| B | R | M | T | T | CHN |
| B | S | A | A | A | FPA |
| V | A | E | Q | Q | RAE |
| 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 221 |

ACACACTACTGGTGTACCTGTCATCTTTGGAATTGTAACAACCTGAAACATCGAACAGGCTATCGAGCGTGCCGGCACAAAAGCGGGCAACAAAGGTGTAGA
 TGTGATGACCACATGGACAGTAGAAACCTTAACATTGTTGACTTTTGTAGCTTGTCCGATAGCTCGCACGGCGGTGTTTTGCGCCGTTGTTCCACATCT

4500

h y w c t c h l w n c n n . k h r t g y r a c r h k s g q q r c r
 t t g v p v i f g i v t t e n i e q a l e r a g t k a g n k g v d
 t l l v y l s s l e l . q l k t s n r l s s v p a q k r a t k v . i
 c . q h v q . r q f q l l q f c r v p . r a h r c l l p c c l h l
 f v v p t g t m k p i t v v s f m s c a i s r a p v f a p l l p t s
 v s s t y r d d k s n y c s f v d f l s d l t g a c f r a v f t y

FIGURE 30

| | | | | | |
|---|----|-----------------------|----|--|---|
| B | MD | | MD | | H |
| S | SR | | SR | | P |
| T | EA | B-RYBOFLAVIN SYNTHASE | EA | | H |
| X | 11 | TRANSLATION STOP | 11 | | 1 |

P3 PROMOTER

TTGTGCTGTTTCTGCCATTGAAATGGCAAAATTTAAACCGCTCATTGGAATAATTTGCTGAAAACAGTTTAAAAATATGCCAAAATGATATAATGTGAGA
 AACACGACAAAGACGGTAACCTTTACCGTTTAAATTTGGCGAGTAACTTATTAACGACTTTTGTCAAATTTTATACCGCTTTTACTATATTACACTCT

l c c f c h . n g k f k p l i . i i c . k q f k n m a k m i . c e k
 c a v s a i e m a n l n r s f e . f a e n s l k i w r k . y n v r
 v l f l p l k w q i . t a h l n n l l k t v . k y g e n d i m . e
 n h q k q u q f p l n l g s m q i i q q f c n l f i a f i i y h s
 q a t e a m s i a f k f r e n s y n a s f l k f i h r f h y l t l
 i t s n r g n f h c i . v a . k f l k s f v t . f y p s f s i i h s

| | | | | | |
|------|---|---|--|---|---|
| BM D | H | M | | M | H |
| IB P | N | S | | S | N |
| NO N | F | E | | E | F |
| 11 1 | 3 | 1 | | 1 | 3 |

RBS ORF 2

AAACGGATCACCTATTTCGTATCCGTTAATAGCAGACTGGACATTTTGGATATAGAGGGGTTTTATGTTAATTCGTTATAAAAAATCGTTTGAAAAGATT
 TTTGCCTAGTGGATAACCATAGCCAATTATCGTCTGACCTGTAAACCTATATCTCCCCAAAATACAATTAAGCAATATTTTTAGCAAACTTTTCTAA

t d h l f v s v n s r l d i l d i e g f l c . f v i k n r l k r l
 k r i t y s y p l i a d w t f w i . r g f y v n s l . k i v . k d c
 n g s p i r i r . . q t g h f g y r g v f m l i r y k k s f e k i
 f v s . r n t d t l l l s a m k s i s p n k h . n t i f f r k f l n
 f r i v . e y g n i a s q v n q i y l p k . t l e n y f i t q f s
 f p d g i r i r . y c v p c k p y l p t k i n i r . l f d n s f i

| | | | | | | | |
|---|-----|-------|---|---|--|---|---|
| H | EAM | F A E | B | M | | E | A |
| H | CFS | N L C | B | S | | C | L |
| F | PLE | U U 1 | V | E | | P | U |
| 3 | 121 | H 1 5 | 1 | 1 | | 1 | 1 |

//

GCGATGGGGCTTCTTTCGTTTATGCCGAATGAAAAAGACCTTAAGCAGCTTCAGCAGACAATTAAGGACTACGAAAACGGATACAGACCGCCAGCTCTTC
 CGCTACCCCGAAGAAACCAATACGGCTTACTTTTCTGGAATTCGTCGAAGTCGTCTGTTAATTCCTGATGCTTTCCTATGCTCGCGGTGAGAAAG

r w g f f r l c r m k k t l s s f s r q l r t t k r i q t a s s f
 d g a s f v y a e . k r p . a a s a d n . g l r n g y r p p a l s
 a m g l l s f m p n e k d l k q l q q t i k d y e t d t d r q l f l
 r h p k k r k h r i f f v k l i k l l c n l v v f r i c v a l e k
 q s p a e k t . a a h f l g . a a e a s l . p s r f p y l g g a r e
 a i p s r e n i g f s f s r l c s . c v i l s . s v s v s r w s k

FIGURE 3P

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|----|---|
| M | N | E | H | T | P | M | H | D | XND | HB | N |
| N | N | C | N | A | L | N | N | D | HBP | PI | N |
| L | L | R | F | Q | E | L | F | E | OCN | AM | F |
| 1 | 1 | V | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 211 | 21 | 1 |

TTTGGAAAGAGGACGAGGATATCGTGGAGCAATCGGAGTCGAAAAAAGGATTCTGAGTTGAGATCCGGCATATCAGTGTGAATCCTTCTCATCGCCA
 AAACCTTTCTCCTGCTCTATAGCAGCCTCGTTAGCCTCAGCTTTTTTCTTAAGACTCCAAGTCTAGGCGGTATAGTCACACTTAGCAAGAGTAGCGGT

f g k r t r i s s e q s e s k k r i l r l r s g i s v . i l l i a i
 l e r g r g y r r s n r s r k k g f . g . d p a y q c e s f s s p
 w k e d e d i v g a i g v e k k d s e v e i r h i s v n p s h r h
 k p f l v l i d d s c d s d f f l i r l n l d p m d t h i r r m a
 k s l p r p y r r l l r l r f f p n q p q s g a y . h s d k e d g
 r q f s s s s i t p a i p t s f f s e s t a i r c i l t f g e . r w

| | | | | | | | | | |
|---|---|----|---|----|---|---|---|----|---|
| H | S | MD | F | SR | N | M | A | AT | M |
| N | F | SR | O | CS | L | S | L | SA | A |
| F | A | EA | K | AA | A | E | U | UQ | E |
| 1 | N | 11 | 1 | 11 | 4 | 1 | 1 | 21 | 2 |

TCAAGGAATCGGAAAACAGATGATGGATGCTTTAAAGCATTATTCAAACCGCAAGTACTGGTTCCAAATGAATTAACGCAGAGCTTTTCGAACGTTGT
 AGTTCCTTAGCCTTTTGTCTACTACCTACGAAATTCGTAATAAGTTTTCGGTTCATGACCAAGGTTTACTTAATTCGGTCTCGAAAAAGCTTGCAACA

k e s e n r . w m l . s i y s k r k y w f q m n . r r a f s n v v
 s r n r k t d d g c f k a f i q n a s t g s k . i n a e l f r t l s
 q g i g k q m m d a l k h l f k t q v l v p n e l t q s f f e r c
 m l s d s f l h h i s . l m . e f r l y q n u l f . r l a k e f t t
 d l f r f v s s p h k l a n i . f a l v p e l h i l a s s k r v n
 . p i p f c i i s a k f c k n l v c t s t g f a n v c l k k s r q

| | | | | | | | | |
|---|------|------------------------|---|-----|---|---|---|--|
| E | SHD | MM | A | SHD | A | B | E | MB |
| C | IBP | NS | L | CBP | L | S | C | AS |
| 1 | NO N | LE | W | LOW | W | M | O | EA |
| 5 | 11 1 | ORF 2 TRANSLATION STOP | N | 111 | N | 2 | 8 | RHO-INDEPENDENT TRANSCRIPTION TERMINATOR |

CAAGGTCAGCAGGATCAAGACATTTACATAATAATTAAGCAGAGGCTGTGATCAGTCTCTGCTTTTTTTCTGCGTTCTATTTCTTTTTCAGGTTCCAG
 GTTCCAGTCGCTAGTTCTGTAAGTATGTTATTAATTCGTCTCCGACACTAGTCAGACAGCAAAAAAGACGCAAGATAAAGAAAAAGTGAAGTGC

k v s r i k t f h t i i k q r l . s v s e f f s a f y f f f t f t
 r s a g s r h f i q . l s r g c d q s l l f f l r s i s f s r s r
 q g q q d q d i s y n n . a e a v i s l c f f f c v l f l f h v h g
 l t l l i l v n . v i i l c i s h d t e a k k e a n . k k k v n v
 d l d a p d l c k m c y n l l p q s . d r s k k r r e i e k e r e r
 . p . c s . s m e y l l . a s a t i l r q k k k k q t r n r k . t .

FIGURE 3Q

| | | | | | | | | | |
|------|------|---|-----|------|----|---|-----|---|-----|
| AM A | FM D | B | S T | DB A | HN | F | SNA | B | TMH |
| HA A | OB P | I | P A | DB P | GS | N | NLC | S | ABN |
| AE T | KO N | N | O O | EV L | IP | U | AAC | M | OOF |
| 22 2 | 11 1 | 1 | 1 1 | 11 1 | AZ | H | 131 | 1 | 113 |

GATGACGTCAGTCCGATCCCGCAACGGTGTGTCGATAAGAAATATGTTGCTGAGTGCAGTGGGCTGCCCCATGTATACCTTTTTTCTGCATTCCG
 CTACTGCAGTCAGGCTAGGGCGTTTGGCACAACAGCTATTCTTTATACAAGCACTCAGTGACCCGACGGGGTACATATGAAAAAAGGACGTAAGC

ddvspiipqtvfvdkkyvaectglppcillffpaf
 mtsvrsrkrcslsirnmlslsalgcpvhvyffflhs
 .rqsd pangvcr.eiccc.vhwaapmytffscir
 sstlgigevntslfytashvpssghiskkgan
 ivdtrdrllrhkdlifinslaapqgutykkkrce
 phr.dsqaafptqrysishqqtcqaagmyvkkeqmr

| | | | | | | |
|-----|-----|---|---|---|----|---|
| D B | SNN | B | M | B | ST | T |
| P I | PSL | S | N | S | PA | A |
| N N | HPA | R | L | M | OQ | O |
| 1 1 | 1H3 | 1 | 1 | 2 | 11 | 1 |

ATCCTGCATGCTTCTCCAGTTTCTCATCTTTGATTGGCAGTATAATGCTTTTATAGGCAGAGACGGTTTCCGATTGTTTCGTAAACCGATTGCATAAGTT
 TAGGACGTACGAAGGAGGTCAAGAGTAGAACTAACCGTCATATTACGAAAATATCCGCTCTCTGCCAAAGCTAAACAAGCATTTGGCTAACGTATTCAA

pacflqlqflifdwqynafigr'dgfdlfnrlhkf
 ilhasssfaaligsimll.aetvaiscs.tdciss
 scmlppvshl.lav.cfyrrqrrfrfvrkpia.v
 sgahkrwnrmksqcyalakiplspkkntrfncin
 ircaeeelkedkplliiskyasvteiqeyvsqml
 dqmssgte.rqnatyhk.lcllrnrntrlgiayt

| | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|----|-----|-----|----|---|---|--------|
| GCH | BNMD | M D | TB | NSH | S H | BH | M | F | BSBNH |
| DFA | CLSP | B D | AB | CCP | F W | SP | B | O | SESCCP |
| IRE | LAON | O E | OV | IRA | A F | PA | O | X | ACAIRA |
| 213 | 1311 | 2 1 | 12 | 112 | N 1 | 22 | 2 | 1 | J1J112 |

CGAGCAACGGCCATGATCAAGCCCTAAGTCTTCGACTGCCCGGTGTCTGCTTGAAGAAATCCGGATGCTGTTGCCCATCAGTCTTTTTGCCCGCGGTGT
 GCTCGTTTGCCCGTACTAGTTCCGGATTGAGAAGCTGACGGGCCACAAGACCACTTCTTAGGCTACGACAAGCGGTAGTCAGAAAAACGGGGCCGACA

eqtamikp.vfdcpvfclknpdavrhqsfcpgc
 skrp.sspkssatarcsa.rirmifaislfpav
 ranghdqalslrllpgvllleesgcspsvflprly
 scvamilg.tksqgtngkf fgsatru.dkqgpq
 ellrghdlgldevarheaqlirrisnamlrkagat
 rafpws.arllrrsgptrrsssdphqegdtkkgrs

FIGURE 3R

| | | | | |
|---|---|------|---|---|
| A | M | EXND | M | S |
| L | B | IHBP | B | S |
| U | O | NOON | O | P |
| 1 | 2 | 1211 | 2 | 1 |

ATTCTGCCTTCTGTGATGATATAAAGCCACTGCAAGCTGAATAAAGCCCAATAGCGTTTCGTTTCTTTGGCGGATCTTCCTTCCAATATTCTTCT
 TAAGACGGAAGACACTACTATATTTGGGTGACGTTGACTTATTTGGGTGGGTATCGCAAAAGCAAAGAAACCGCTAGAAGGAAGGTTATAAGAAGA 5500

i l p s v m l . s h e k l n k a h p i a f s f l w r i f l p i f f .
 f c l l . . y k a t a s . i k p t q . r f r f f g g s s f q y s s
 s a f c d d i k p l q a e . s p p n s v f v s l a d l p s n i l l
 i r g e t i i y l w q l s f l a w g i a n e n r q r i k r g i n k
 n q r r h h y l a v a l q i f g v u y r k r k k p p d e k w y e e
 y e a k q s s i f g s c a s y l g g l l t k t e k a s r g e l i r r

| | | | |
|---|----|---|----|
| S | NB | M | HA |
| S | LS | L | IL |
| P | AM | A | NU |
| 1 | 31 | 3 | 31 |

AATATTTTCATGGCATTCAAAATAATCCCGTGTCCGATGAAACTCAACGAGATAATCTATATAAGCTT
 TTATAAAGTACCGTAAGTTTATTAGGGCACAGCGTACTTTGAGTTGCTCTATTAGATATATTCGAA 5567

y f m a f k i i p c r m k l n e i i y i s f
 n i s w h s k . s r v a . n a t r . s i . a s
 i f h g i q n n p v s h e t q r d n l y k l
 . y k m a n l i i g h r m f s l s i i . i l k
 l i e h c e f y d r t a h f e v l y d i y a q
 i n . p m . f l g t d c s v . r a l r y l s a

FIGURE 3S

FIGURE 4.

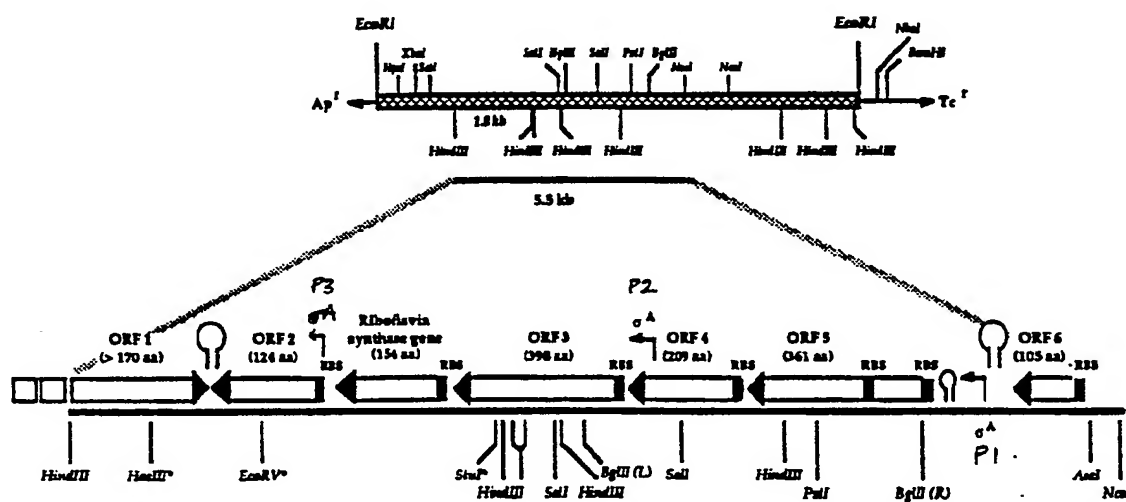


FIGURE 5.

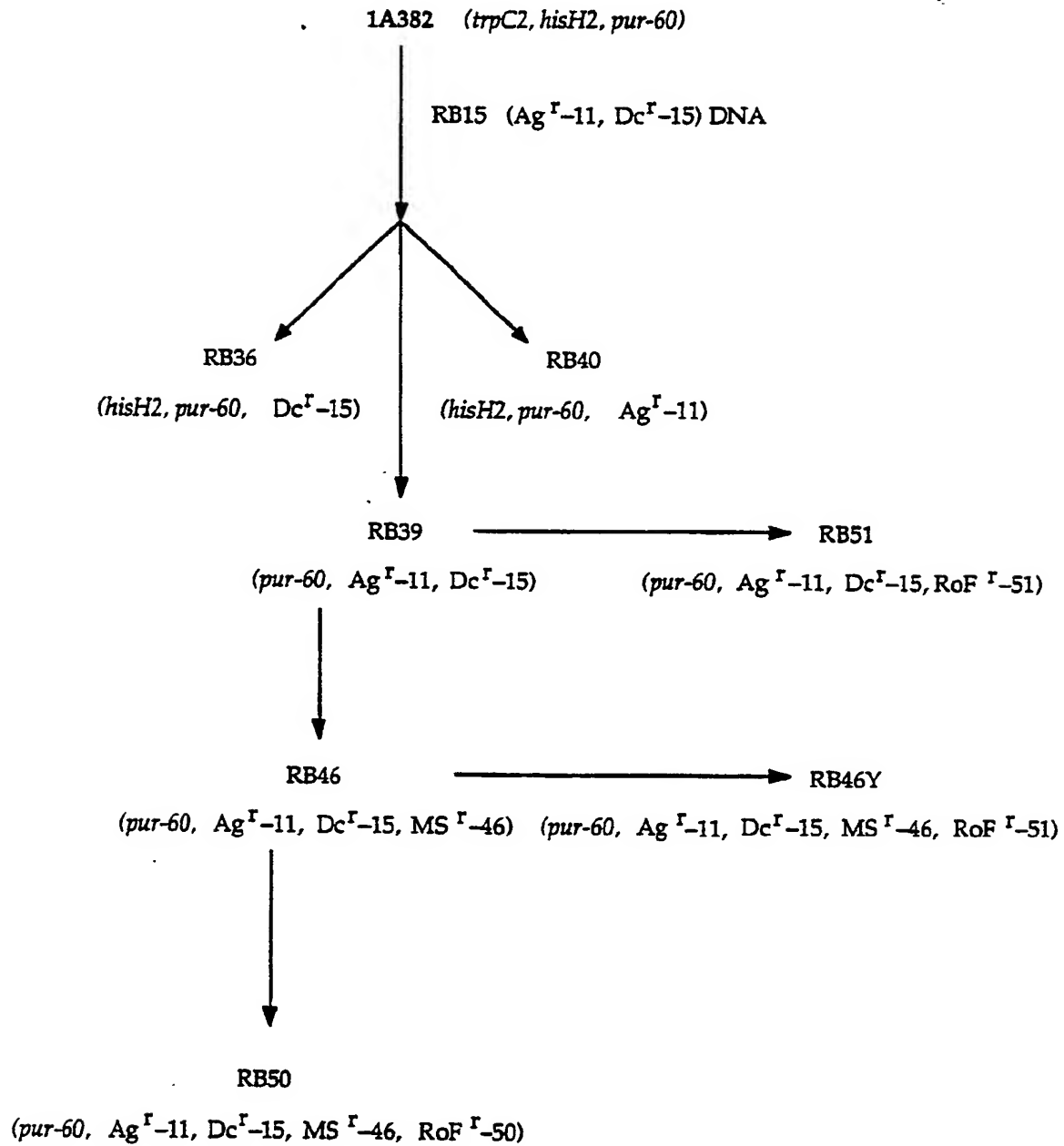


FIGURE 6.

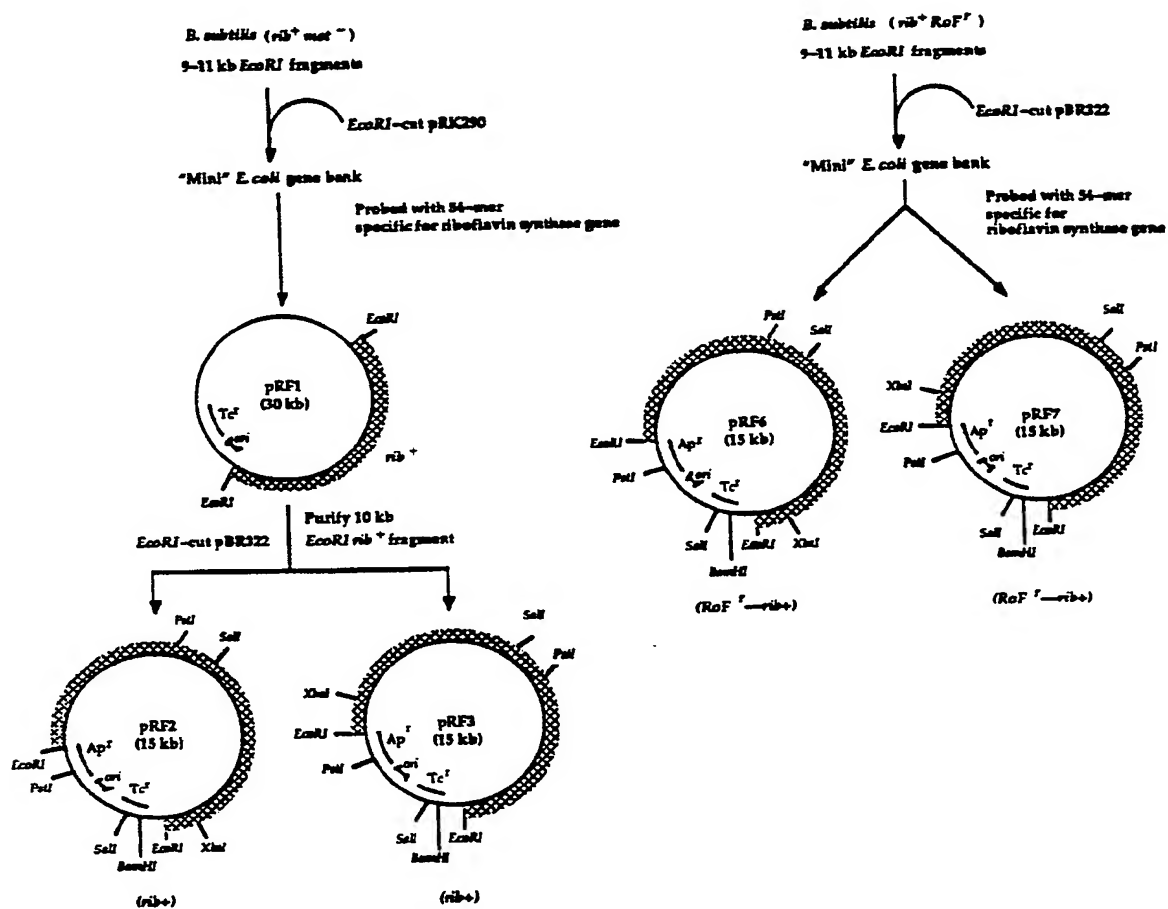


FIGURE 7.

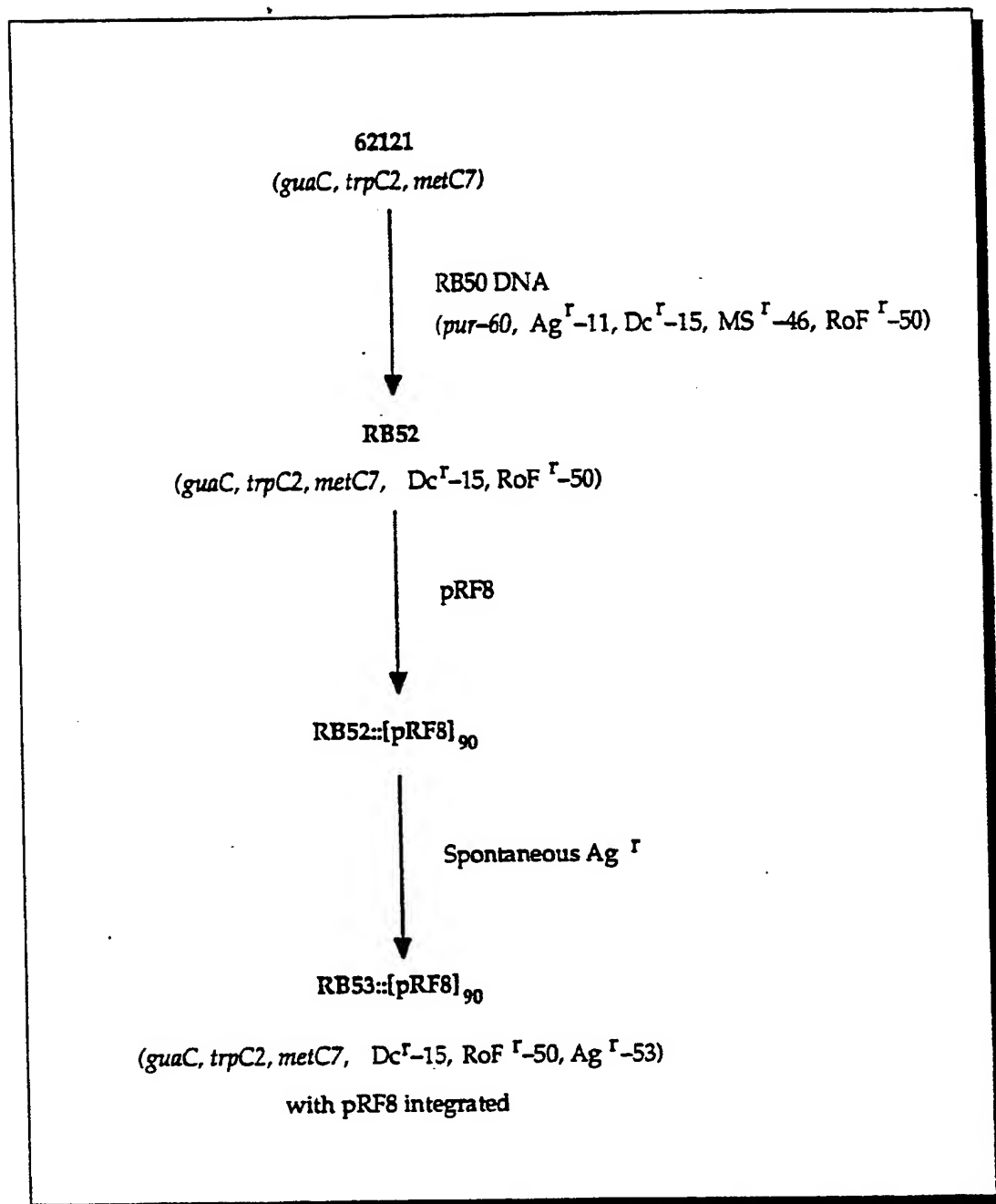


FIGURE 8.

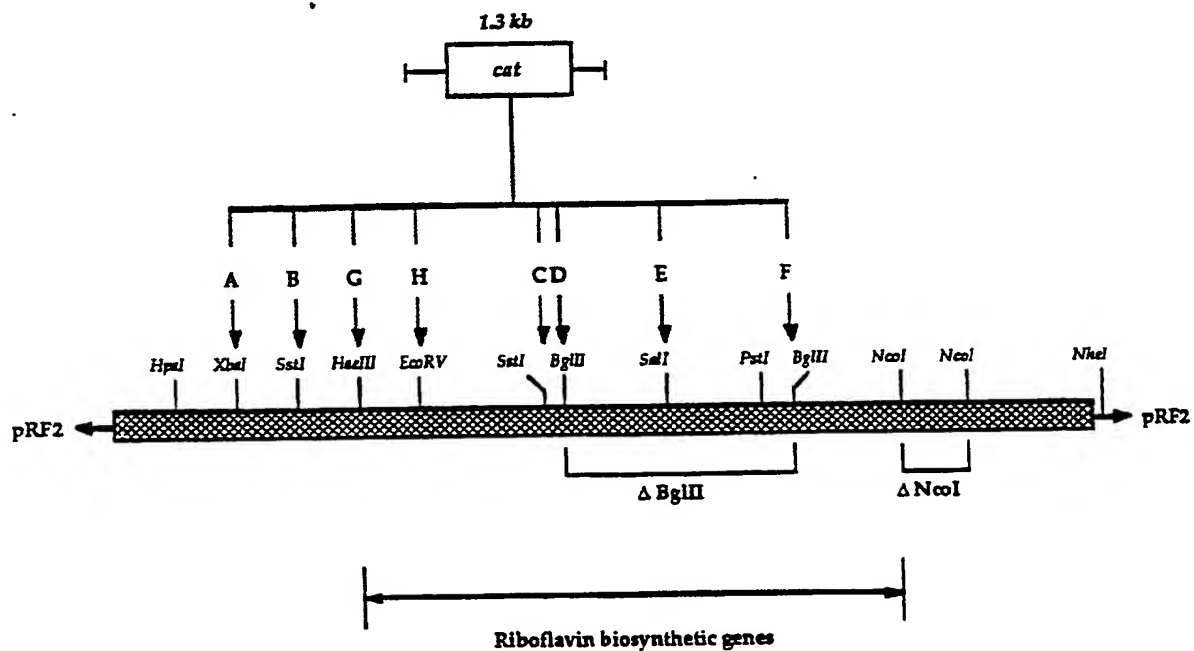
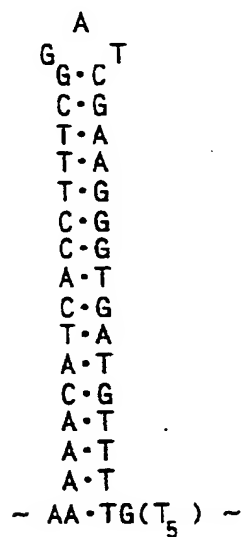


FIGURE 9.

*Upstream from
ribP1*

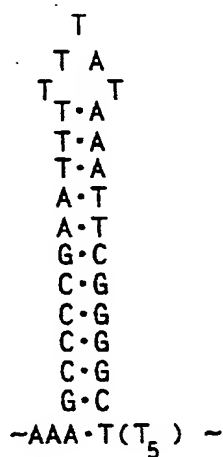
*Within 5'
leader mRNA*

*At 3' end of
rib operon*



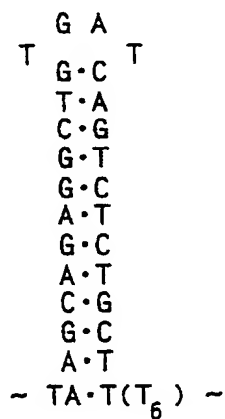
#708

#742

 $\Delta G = -20 \text{ kcal/mol}$ 

#1034

#1062

 $\Delta G = -26 \text{ kcal/mol}$ 

#5037

#5064

 $\Delta G = -16.5 \text{ kcal/mol}$

FIGURE 10.

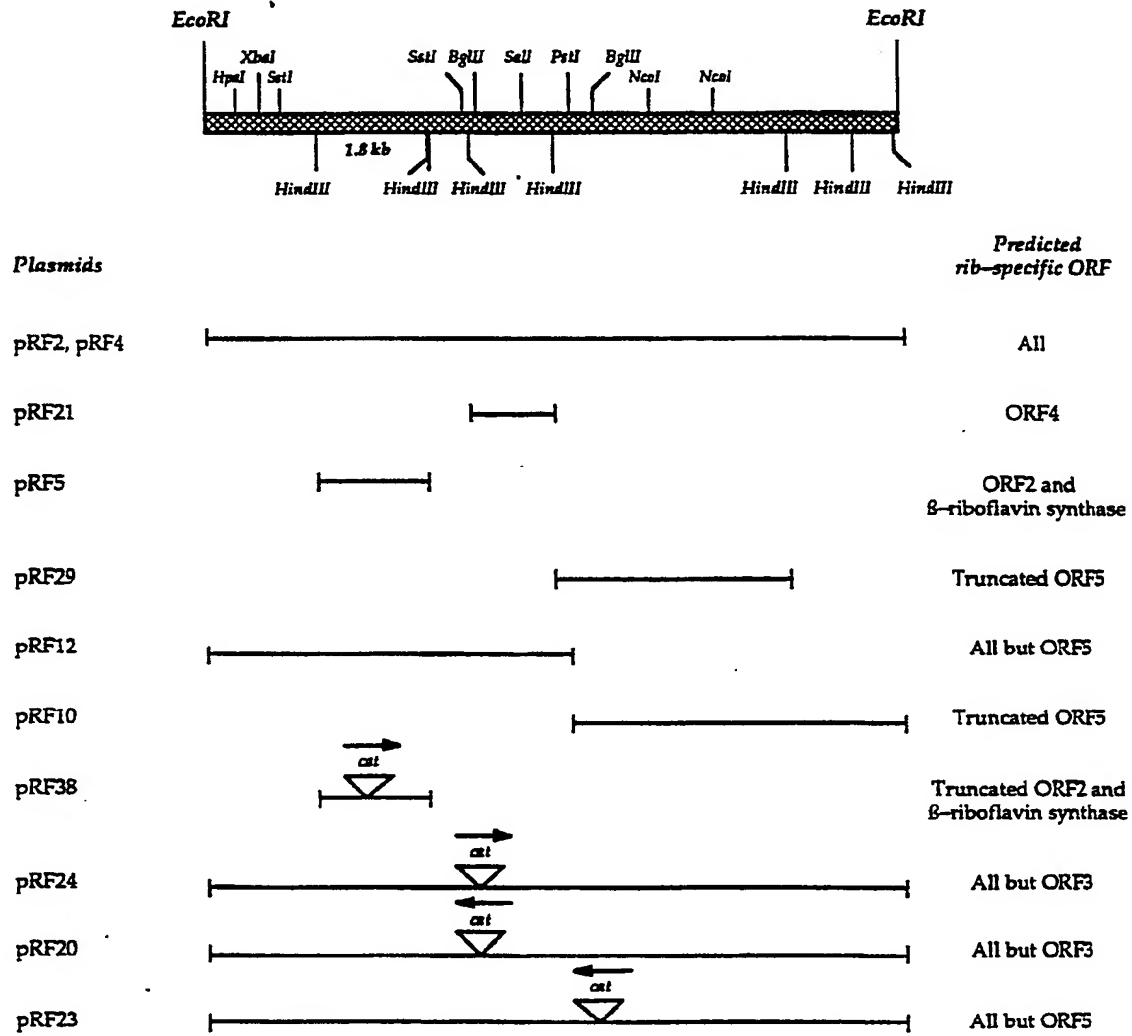


FIGURE 11.

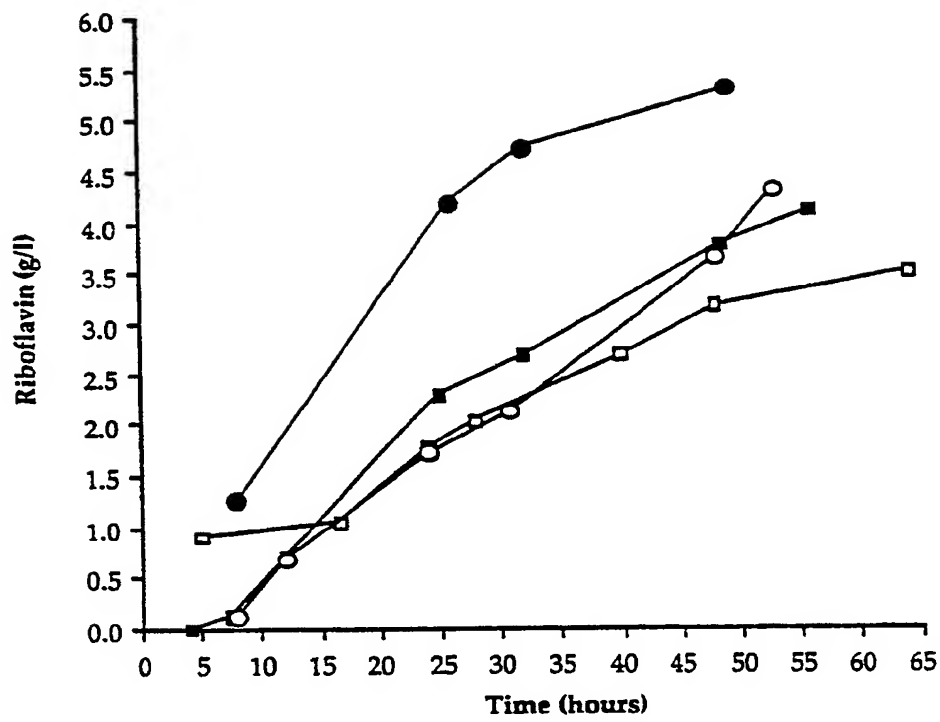


FIGURE 12.

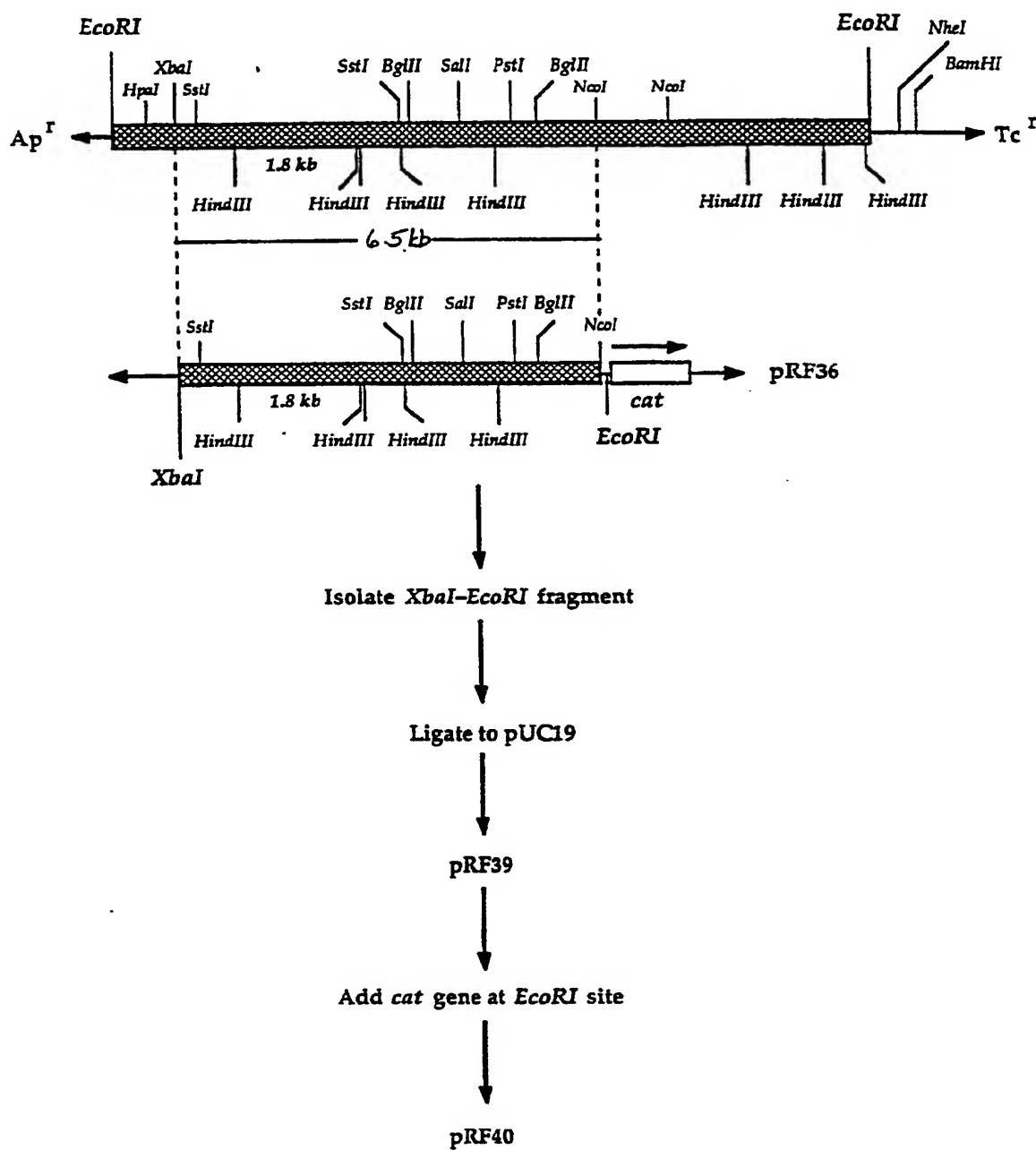
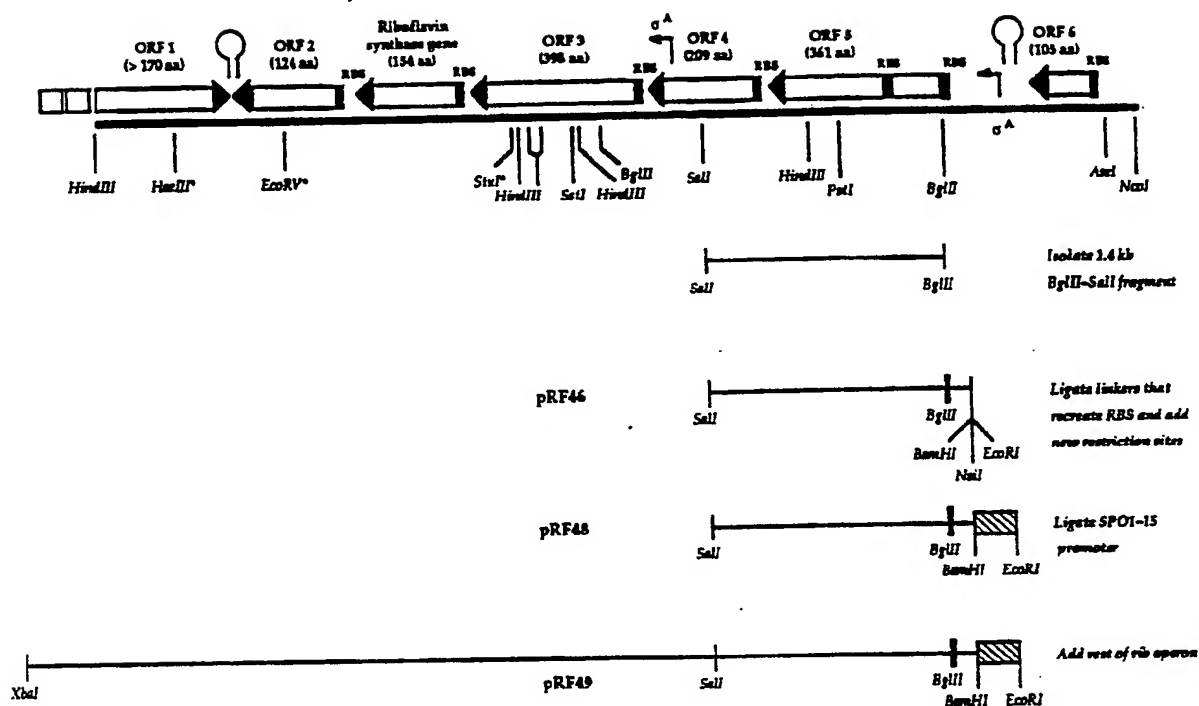


FIGURE 13.



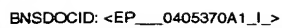


FIGURE 15.

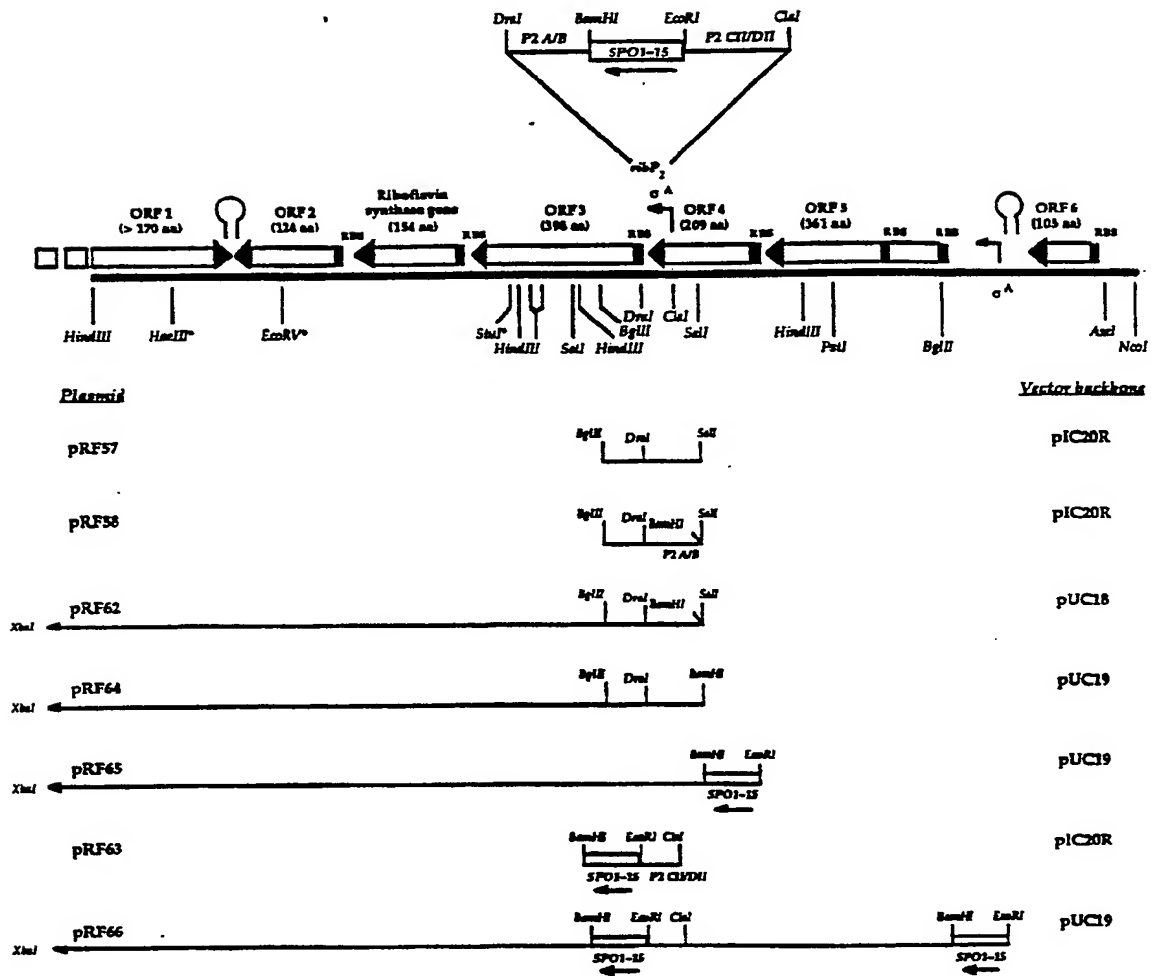


FIG. 16

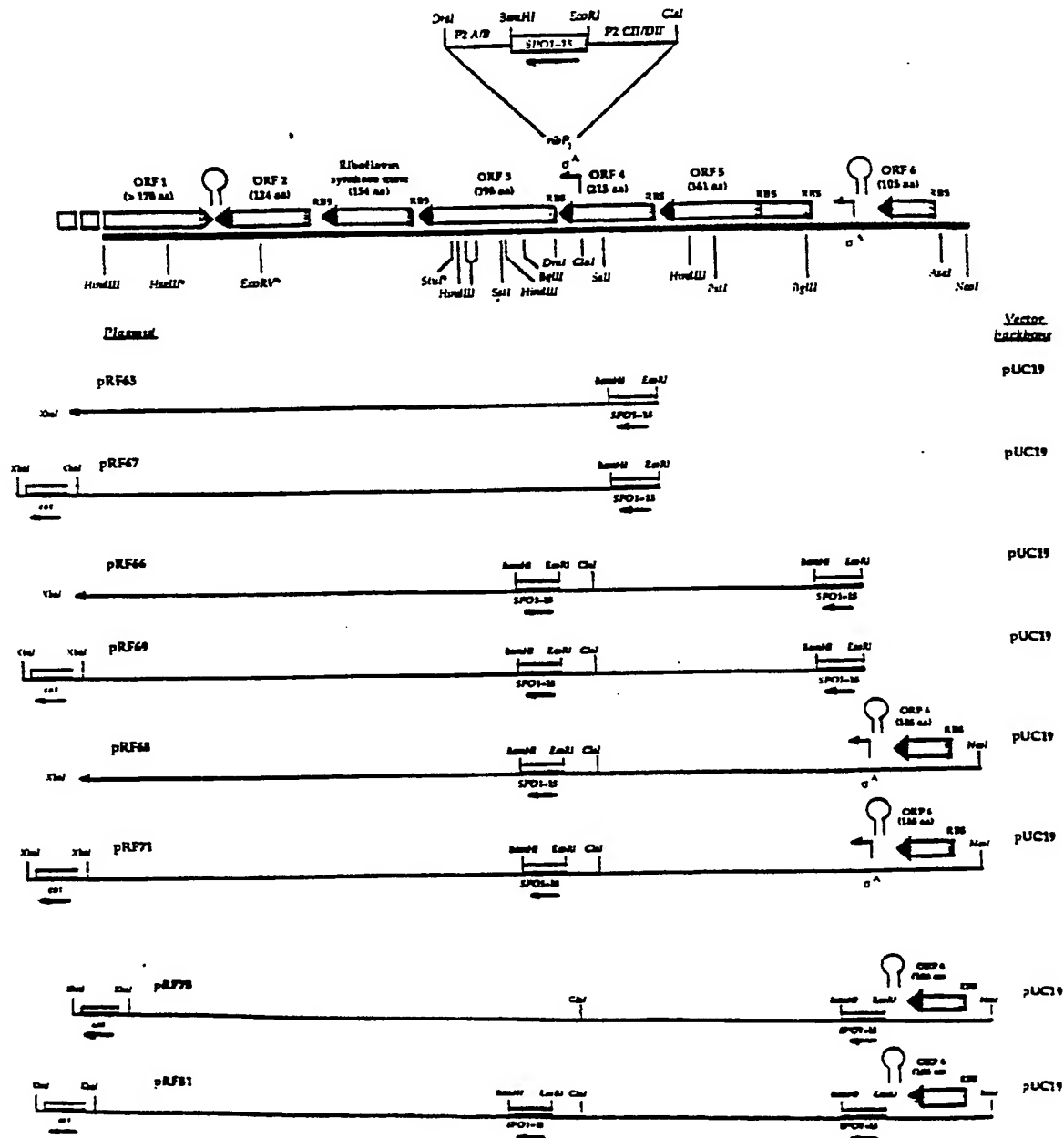


FIG. 17

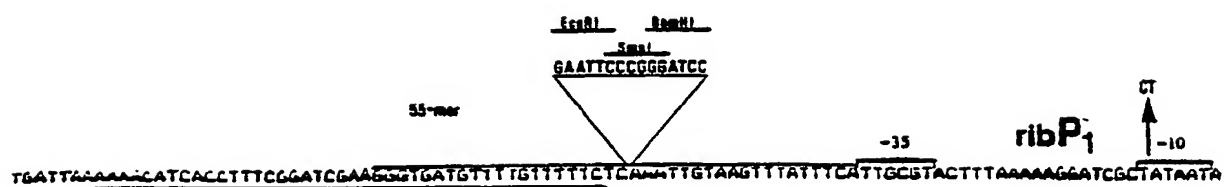


FIGURE 18

RB-5

AATTCATGCATGGATCCGACGGTAAATAAC
AAAAGAGGGGAGGGAAACAAATGGAAGAGT
ATTATATGAAGCTGGCCTTA

RB-6

GATCTAAGGCCAGCTTCATATAATACTCTT
CCATTTGTTTCCCTCCCCTCTTTTGTTATT
TACCGTCGGATCCATGCATG

P2-A

TCGACGGATCCTTTTAGAGAGGAAGATTTG
CATGTTTCATCCGATAGAAGAAGCACTGGA
CGCTTT

P2-B

AAAGCGTCCAGTGCTTCTTCTATCGGATGA
AACATGCAAATCTTCCTCTCTAAAAGGATC
CG

P2-CII

CGATTTTGCATAAAGCCAATGAAAATAAG
ACCCAACAAACCATTACAAAAGCCTTCTTA
AGCGAAAACGGCTTTTAG

P2-DII

AATTCTAAAAGCCGTTTTTCGCTTAAGAAGG
CTTTTGTAATGGTTTGTTGGGTCTTATTTT
CATTGGCTTTATGCAAAAAT



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 90 11 1916

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
|--|--|--|---|
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages | Relevant to claim | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5) |
| D,Y | FR-A-2 546 907 (VSESOJUZNY NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKY INSTITUT GENETIKI I SELEKTSII PROMYSHLENNYKH MIKROORGANIZMOV (VNIIGENETIKA)) * Whole document * | 1-5,8- 13,15 | C 12 N 15/52 C 12 P 25/00 C 12 N 1/20 // (C 12 N 1/20 C 12 R 1:125 C 12 R 1:19) |
| Y | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 88, no. 23, 5th June 1978, page 293, abstract no. 166562b, Columbus, Ohio, US; P.M. RABINOVICH et al.: "Expression in Escherichia coli cells of the Bacillus subtilis riboflavin operon in hybrid plasmids pPR1 and pPR2", & DOKL. AKAD. NAUK SSSR 1978, 238(6), 1459-61 * Whole abstract * | 1-5,8- 13,15 | |
| Y | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 97, no. 11, 13th September 1982, page 214, abstract no. 86284h, Columbus, Ohio, US; J. JOMANTIS et al.: "Method for the successive cloning of linked sites of Bacillus chromosomes", & DOKL. AKAD. NAUK SSSR 1982, 264(2), 482-4 * Whole abstract * | 1-5,8- 13,15 | |
| Y | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, no. 15, 11th April 1983, page 177, abstract no. 120613x, Columbus, Ohio, US; L.I. PANINA et al.: "Cloning genes of the riboflavin biosynthesis operon of Bacillus subtilis on the plasmid pBR322 vector in Escherichia coli", & GENETIKA (MOSCOW) 1983, 19(1), 174-6 * Whole abstract * | 1-5,8- 13,15 | |
| The present search report has been drawn up for all claims | | | |
| Place of search THE HAGUE | | Date of completion of the search 28-09-1990 | Examiner DESCAMPS J.A. |
| CATEGORY OF CITED DOCUMENTS | | | |
| X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document | | T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document | |

EPO FORM 1503 03.82 (P0401)



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Page 2

Application Number

EP 90 11 1916

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
|---|---|---|---|
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages | Relevant to claim | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. CL.5) |
| Y | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 100, no. 15, 9th April 1984, page 138, abstract no. 115822v, Columbus, Ohio, US; P.M. RABINOVICH et al.: "Cloning genetic material in Bacillus", & MOL. BIOL. (MOSCOW) 1984, 18(1), 189-96 * Whole abstract * | 1-5,8-13,15 | |
| Y | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 101, no. 19, 5th November 1984, page 157, abstract no. 164714r, Columbus, Ohio, US; O.V. OKUNEV et al.: "Cloning in Escherichia coli of a DNA fragment of Bacillus subtilis containing the genes for lysine and riboflavin biosynthesis", & GENETIKA (MOSCOW), 1984, 20(7), 1061-6 * Whole abstract * | 1-5,8-13,15 | |
| Y | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 102, no. 23, 10th June 1985, page 160, abstract no. 198921s, Columbus, Ohio, US; P.M. RABINOVICH et al.: "Cloning of genetic material in Bacilli", & BIOTECHNOL. BACILLI [PROC. INT. CONF.]. 2nd 1983 (Pub. 1984), 297-308 * Whole abstract * | 1-5,8-13,15 | |
| The present search report has been drawn up for all claims | | | TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. CL.5) |
| Place of search THE HAGUE | | Date of completion of the search 28-09-1990 | Examiner DESCAMPS J.A. |
| CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons * : member of the same patent family, corresponding document | | | |

EPO FORM 150 (04/82) (P4601)